

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología I



TESIS DOCTORAL

Implicación de la vía de señalización BMP en las células dendríticas y linfocitos T CD4⁺ humanos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Víctor García Martínez

Directores

Alberto Varas Fajardo
Rosa Sacedón Ayuso

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**Facultad de Medicina
Departamento de Microbiología I**



Implicación de la vía de señalización BMP en las células dendríticas y linfocitos T CD4⁺ humanos

**Facultad de Medicina
Departamento de Biología Celular**

Víctor Manuel García Martínez

D. Alberto Varas Fajardo, Profesor Titular de Universidad
Departamento de Biología Celular
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid

y

Dña. Rosa Sacedón Ayuso, Profesor Titular de Universidad
Departamento de Biología Celular
Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid

Certifican que D. Víctor Manuel García Martínez, Licenciado en Biología, ha realizado bajo su dirección y en el Departamento de Biología Celular de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, el trabajo titulado: “Implicación de la vía de señalización BMP en las células dendríticas y linfocitos T CD4⁺ humanos”, considerando que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor en Inmunología.

VºBº de los DIRECTORES

El interesado

Fdo. Alberto Varas Fajardo Fdo. Rosa Sacedón Ayuso

Víctor Manuel García Martínez

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Microbiología I



Implicación de la vía de señalización BMP en las células dendríticas y linfocitos T CD4⁺ humanos

Facultad de Medicina

Departamento de Biología Celular

TESIS DOCTORAL

Víctor Manuel García Martínez

2014

ABREVIATURAS

ActRIA	Receptor tipo I de activina
ActRII	Receptor tipo II de activina
ALK	Quinasa tipo receptor de activina
Akt	Proteína serín-treonín quinasa RAC-alpha
APC	Célula presentadora de antígeno
AR-Smad	Smad específicas de TGF- β /activina
BDCA	Antígeno de las células dendríticas de sangre
BAMBI	Inhibidor de BMP y activina unido a membrana
Bax	Proteína X asociada a Bcl-2
Bcl	Célula B CLL/leucemia
BMP	Proteína morfogenética ósea
BMPRI	Receptor tipo I de BMP
BMPRII	Receptor tipo II de BMP
BR-Smad	Smad específicas de BMP
BRAM1	Molécula 1 asociada a receptor de BMP
CaMKII	Proteína quinasa II dependiente de calcio/calmodulina
cDC	Célula dendrítica convencional
CFSE	Carboxifluoresceín succinimidil éster
co-Smad	Smad común
ConA	Concanavalina A
CSIB	Complejo de señalización inducido por BMP
CTLA-4	Proteína asociada a linfocito T citotóxica 4
DC	Célula dendrítica
DM	Dorsomorfina
DM-mDCs	Célula dendrítica que ha madurado en presencia de dorsomorfina
DMH1	Homólogo 1 de dorsomorfina
EICH	Enfermedad de injerto contra huésped
Erk	Quinasa regulada por señal extracelular
FSL1	Lipoproteína de <i>Mycoplasma salivarium</i>
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos

GNB2L1	Proteína G de unión al nucleótido guanidina, polipéptido beta tipo 2
I-Smad	Smad inhibidora
ICOS	Co-estimulador inducible de células T
ID	Inhibidor de unión a ADN / de diferenciación
iDC	Célula dendrítica inmadura
IDO	Indol 2,3-dioxigenasa
IL	Interleuquina
IFNγ	Interferón gamma
IRF	Factor regulador de interferón
JNK	Quinasa N-terminal de c-Jun
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
mDC	Célula dendrítica madura
MEK	Quinasa activadora de Erk
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MMR	Receptor de manosa de macrófagos
MoDC	Célula dendrítica derivada de monocito
MyD88	Proteína 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide
NF-KB	Factor nuclear kappa B
NFAT	Factor nuclear de células T activadas
NK	célula <i>natural killer</i>
OX40	Antígeno de superficie celular OX40
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD-1	Muerte celular programada 1
PD-L	Ligando de PD-1
pDC	Célula dendrítica plasmacitoide
PGE2	Prostaglandina E2
PI3K	Fosfatidilinositol 3- quinasa
PKC/D	Proteína quinasa C ó D
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
PolyI:C	Ácido poliinosínico:policitidílico
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones moleculares

RPF	Receptor preformado
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
RUNX	Factor de transcripción relacionado con runt
siRNA	Ácido ribonucleico pequeño de interferencia
SOCS1	Supresor de señal de citoquinas 1
Src	Proteína tirosín quinasa Src
ssRNA	Ácido ribonucleico de cadena simple
ST	<i>Salmonella typhimurium</i>
STAT	Transductor de señal y activador de transcripción
TAB1	Proteína 1 de unión a TAK1
TAK1	Quinasa 1 activada por TGF- β
TCR	Receptor de células T
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TLR	Receptor tipo toll
TNFα	Factor de necrosis tumoral alpha
TRIF	Adaptador con dominio TIR inductor de interferón beta
XIAP	Inhibidor de apoptosis ligado a X
4-1BB	Antígeno de células T 4-1BB

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	5
1. PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS.....	6
2. COMPONENTES DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN BMP.....	7
3. REGULACIÓN DE LA SEÑAL BMP.....	12
4. FUNCIÓN DE LAS BMPs.....	14
4.1 Función de las proteínas BMP en el sistema inmunitario.....	17
4.1.1 Proteínas BMP y linfocitos T.....	17
4.1.2 Proteínas BMP y linfocitos B.....	18
4.1.3 Proteínas BMP y células NK.....	18
4.1.4 Proteínas BMP y monocitos.....	19
4.1.5 Proteínas BMP y macrófagos.....	19
4.1.6 Proteínas BMP y células dendríticas (DCs)	20
5. CÉLULAS DENDRÍTICAS (DCs)	20
5.1 DCs plasmacitoides.....	21
5.2 DCs convencionales.....	21
6. Funcionalidad de las DCs.....	22
7. Células dendríticas derivadas de monocitos (MoDCs) y vacunas terapéuticas.....	25
OBJETIVOS.....	28
MATERIAL Y MÉTODOS.....	30
1. Obtención de muestras humanas.....	31
2. Generación y cultivo de MoDCs.....	31
3. Cultivo de cDCs.....	33
4. Cultivo de linfocitos T CD4+ vírgenes.....	33
5. Determinación de la respuesta proliferativa de los linfocitos T.....	34
6. Funcionalidad de la vía de señalización BMP y regulación de genes diana.....	35
7. Análisis por RT-PCR punto final.....	35
8. Análisis por PCR cuantitativa en tiempo real.....	36
9. Citometría de flujo.....	37
10. Ensayo de apoptosis.....	39
11. Ensayo de internalización.....	39
12. Determinación de factores solubles en sobrenadantes.....	39
13. Reacción mixta de linfocitos (MLR)	40
14. Activación de células NK mediante co-cultivo con DCs autólogas.....	40
15. Silenciamiento de IRF1 en iDCs.....	41

16. Análisis estadístico.....	42
RESULTADOS.....	43
1. Expresión y funcionalidad de la vía de señalización BMP en las MoDCs.....	44
1.1 Las MoDCs expresan los componentes principales de la vía.....	44
canónica de señalización BMP	
1.2 La vía de señalización BMP es funcional en las MoDCs.....	45
2. La estimulación de la vía de señalización BMP no afecta a la diferenciación de las MoDCs.....	47
3. Efectos de la activación exógena de la vía de señalización BMP sobre las iDCs....	50
3.1 BMP aumenta la supervivencia de las iDCs pero no de las mDCs.....	50
3.2 La activación de la vía de señalización BMP induce la maduración fenotípica de las MoDCs.....	51
3.3 BMP no modifica la actividad endocítica de las MoDCs.....	53
3.4 La vía de señalización BMP regula la producción de citoquinas en las iDCs....	53
3.5 La capacidad aloestimuladora de las iDCs es potenciada tras la estimulación de la vía de señalización BMP.....	54
3.6 La señalización BMP regula la expresión de los genes RUNX en las iDCs.....	55
4. Efectos de la activación exógena de la vía de señalización BMP en la maduración de las DCs.....	56
4.1 La estimulación exógena de la vía de señalización BMP no modifica la expresión de marcadores de maduración en las mDCs.....	56
4.2 La adición exógena de BMP-4 durante la maduración de las DCs no modifica la adquisición del fenotipo maduro.....	57
5. La vía de señalización BMP se activa durante la maduración de las DCs.....	58
5.1 Las MoDCs producen ligandos BMP.....	58
5.2 La vía canónica de señalización BMP se activa durante el proceso de maduración de las MoDCs.....	60
5.3 La vía de señalización de la p38 MAPK tiene un papel crítico en la inducción de la producción de BMPs durante la maduración de las DCs.....	61
6. Papel de la señalización BMP autocrina/paracrina durante la maduración de las DCs.....	62
6.1 La vía canónica de señalización BMP participa en la regulación de las proteínas ID que se produce durante el proceso de maduración.....	62
6.2 La vía canónica de señalización BMP regula la expresión de las proteínas PD-L1	

y PD-L2 en las DCs.....	64
6.3 El bloqueo de vía canónica de señalización BMP no altera la producción de citoquinas durante la maduración de las DCs.....	66
6.4 La capacidad aloestimuladora de las mDCs se potencia al bloquear la vía canónica de señalización BMP durante su maduración.....	67
6.5 El bloqueo de la ruta canónica de señalización BMP durante la maduración de las MoDCs aumenta su capacidad para activar células NK.....	68
6.6 La vía canónica de señalización BMP regula la expresión del factor de transcripción IRF-1 durante la maduración de las DCs.....	69
6.7 La vía canónica de señalización BMP regula la expresión de PD-L1 y PD-L2 inducida por citoquinas pro-inflamatorias en las cDCs de sangre periférica también a través de IRF1.....	71
7. La vía de señalización BMP se induce en MoDCs en respuesta a diferentes estímulos madurativos.....	74
8. La vía de señalización BMP en los linfocitos T CD4+ vírgenes.....	77
8.1 Los linfocitos T CD4+ vírgenes activados vía CD3/CD28 son capaces de responder a los ligandos BMP.....	77
8.2 La expresión en membrana de BMPRIA se induce en los linfocitos T activados en respuesta a diferentes estímulos.....	78
8.3 Las células T CD4+ BMPRIA+ se generan de forma continuada a lo largo del proceso de activación.....	81
8.4 La estimulación de la vía de señalización BMP regula positivamente la activación de los linfocitos T CD4+ vírgenes inducida a través de TCR.....	82
9. Papel de la vía de señalización BMP en la interacción entre mDCs y linfocitos T CD4+ vírgenes.....	84
9.1 El contacto con mDCs induce la expresión de BMPRIA y la fosforilación de Smad-1/5/8 en los linfocitos T CD4+ vírgenes.....	84
9.2 Las células T activadas por contacto con mDCs que expresan BMPRIA tienen una tasa proliferativa mayor, principalmente en los primeros estadios de la activación.....	85
9.3 El bloqueo de la vía canónica de señalización BMP durante la interacción linfocito T CD4+ virgen-mDC afecta a la proliferación y activación de los linfocitos T.....	87
DISCUSIÓN.....	92

CONCLUSIONES	123
BIBLIOGRAFÍA	125
SUMMARY	143
Introduction	144
Objective	146
Methods	146
Results and discussion	147
Conclusions	149
ANEXO: Publicaciones	153

INTRODUCCIÓN

1. PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS

Las Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMP) forman un amplio grupo de factores de crecimiento secretados, altamente conservados, de los cuales se han identificado más de 20 miembros hasta la fecha, lo cual hace que constituyan el mayor subgrupo de proteínas dentro de la superfamilia del Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF- β)¹. Descubiertas en 1.965 por Marshall Urist y, más tarde, identificadas por Wozney y colaboradores como factores de crecimiento y diferenciación de células osteogénicas^{2,3}, estudios posteriores han llevado a que hoy sean consideradas polipéptidos multifuncionales con un rango de acción mucho más amplio. Además del papel esencial que esta familia de proteínas tiene durante el desarrollo embrionario, como se verá más adelante, las proteínas BMP siguen participando durante el estado adulto en la homeostasis de un gran número de órganos y tejidos⁴.

Como se ha comentado, la familia BMP forma parte de la superfamilia TGF- β , la cual incluye a las proteínas TGF- β , Activinas e Inhibinas, Nodal, Factores de Crecimiento y Diferenciación (GDF), Miostatina y la hormona anti-Mulleriana^{5,6}. De las aproximadamente 20 proteínas que hasta la fecha han sido clasificadas como proteínas relacionadas con las BMPs, aquellas presentes en mamíferos pueden ser subdivididas a su vez en varios grupos basándose en sus estructuras y funciones (Tabla 1): grupo BMP-2/4 (formado por BMP-2 y BMP-4); grupo BMP-3 (formado por BMP-3 y BMP-3b); grupo BMP-5/6/7/8 (también llamado grupo de la proteína osteogénica-1, OP-1, está formado por BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8a y BMP-8b); grupo GDF-5/6/7 (formado por CDMP-1/GDF-5/BMP-14, CDMP-2/GDF-6/BMP-13, CDMP-3/GDF-7/BMP-12 y BMP-15); y grupo BMP-9/10 (formado por BMP-9 y BMP-10). Todos estos miembros de la familia BMP tienen perfiles de expresión espaciotemporal distintos y sus actividades biológicas varían entre unos y otros debido en parte a que su unión a los receptores de BMP presenta afinidades distintas^{5,7}.

Los ligandos BMP son expresados como proteínas precursoras de gran tamaño (400-500 aminoácidos) constituidas por un péptido señal en la región N-terminal que se encarga de dirigir a la proteína hacia la vía secretora, un pro-dominio que asegura el correcto plegamiento de la proteína madura y el denominado péptido maduro que se

extiende hasta el final de la región C-terminal. Estas pro-proteínas forman dímeros, normalmente homodímeros, unidas gracias a un enlace disulfuro. No obstante, desde el aislamiento de un heterodímero formado por BMP-2 y BMP-7 en 1990, son varios los grupos que han observado y generado diferentes heterodímeros cuyo potencial para activar la vía de señalización BMP parece ser incluso mayor que el de sus homodímeros correspondientes^{8,9} (revisado en¹⁰). Las proteínas maduras dimerizadas sufren la proteólisis de su extremo C-terminal dentro de la red trans-Golgi antes de ser secretadas como moléculas activas^{1,11}.

Subgrupo BMP	Miembros (símbolo oficial)	Otros alias
BMP-2/4	BMP-2	BDA-2, BMP-2A
	BMP-4	BMP-2B, BMP-2B1, MCOPS6, OFC-11, ZYME
BMP-3	BMP-3	BMP-3A
	GDF-10	BMP-3b
BMP-5/6/7/8	BMP-5	
	BMP-6	VGR, VGR-1
	BMP-7	OP-1
	BMP-8a	
	BMP-8b	OP-2
GDF-5/6/7	GDF-5	BDA-1C, BMP-14, CDMP-1, LAP-4, OS-5, SYM-1B, SYNS-2
	GDF-6	BMP13, CDMP2, KFM, KFS, KFS-1, KFSL, LCA-17, MCOP-4, MCOPCB6, SCDO4, SGM1
	GDF-7	BMP-12
	BMP-15	GDF-9B, ODG-2, POF-4
BMP-9/10	GDF-2	BMP-9
	BMP-10	

Tabla 1. Miembros de la familia BMP en mamíferos.

2. COMPONENTES DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN BMP

Los miembros de la familia BMP señalizan a través de complejos receptores heterotetraméricos formados por dos tipos de receptores serín-treonín quinasa, llamados receptores tipo I y receptores tipo II (Figura 1). Estos complejos están formados, por lo tanto, por dos unidades de cada tipo de receptor. Aunque los ligandos BMP pueden unirse al receptor tipo I en ausencia del tipo II, ambos son imprescindibles para la

transducción de la señal. Una vez unido el ligando, el receptor tipo II, cuya actividad quinasa es constitutiva, transfosforila al receptor tipo I que es el encargado de transducir la señal intracelular específica. Los dos tipos de receptores comparten propiedades estructurales similares, estando formados por un dominio extracelular relativamente corto, un solo dominio transmembrana y una cola citoplásmica que contiene un dominio serín-treonín quinasa. Como veremos más adelante, los receptores de proteínas BMP son capaces de activar diferentes vías de señalización clásicamente divididas en dos categorías: canónica y no canónicas⁵. La vía canónica es probablemente la más estudiada y se produce a través de las proteínas Smad, las cuales serán descritas en más detalle posteriormente. Una vez activados por los receptores tipo II, los receptores tipo I fosforilan a las Smad reguladas por receptor de BMP (BR-Smad). Las BR-Smads activadas forman complejos heterodiméricos o heterotetraméricos con la Smad mediadora común (co-Smad) que son translocados al núcleo. Allí regulan la transcripción de genes diana a través de la interacción con diversos factores de transcripción, co-activadores y co-represores transcripcionales^{6,12}.

Comenzando por los receptores tipo I, se han identificado en mamíferos 7 receptores tipo I distintos para proteínas de la superfamilia TGF- β , de los cuales tres han sido clásicamente identificados por su capacidad de activar a las proteínas BR-Smad en respuesta a ligandos BMP: el receptor de Activina tipo IA (ActRIA/ALK-2), el receptor de BMP tipo IA (BMPRIA/ALK-3) y el receptor de BMP tipo IB (BMPRIB/ALK-6). Mientras que BMPRIA es expresado en varios tipos celulares, BMPRIB y ActRIA muestran un patrón de expresión mucho más restringido. Aunque la preferencia de los ligandos BMP por unirse a uno u otro complejo receptor puede verse afectada por los receptores tipo II, además de por otros factores, se ha demostrado que es el receptor tipo I el que va a condicionar en mayor medida qué ligando se unirá al complejo⁵. De esta forma, el grupo BMP-2/4 se une preferentemente a BMPRIA y BMPRIB, mientras que los miembros del grupo OP-1 se unen fuertemente a ALK-2 pero débilmente a BMPRIB¹³. Por último, el grupo de GDF-5 se une únicamente a BMPRIB¹⁴, mientras que BMP-9 y BMP-10 al grupo de receptores tipo I ALK-1, compuesto por el propio ActRIA/ALK-2 y ActRLK1/ALK-1¹⁵⁻¹⁷. Por otro lado, tres receptores de BMP tipo II con estructuras similares han sido identificados en mamíferos: BMPRII, ActRIIA y ActRIIB. La expresión de todos ellos se ha descrito en

varios tejidos y, a pesar de sus similitudes estructurales, solo BMPRII es específico de BMPs⁶.

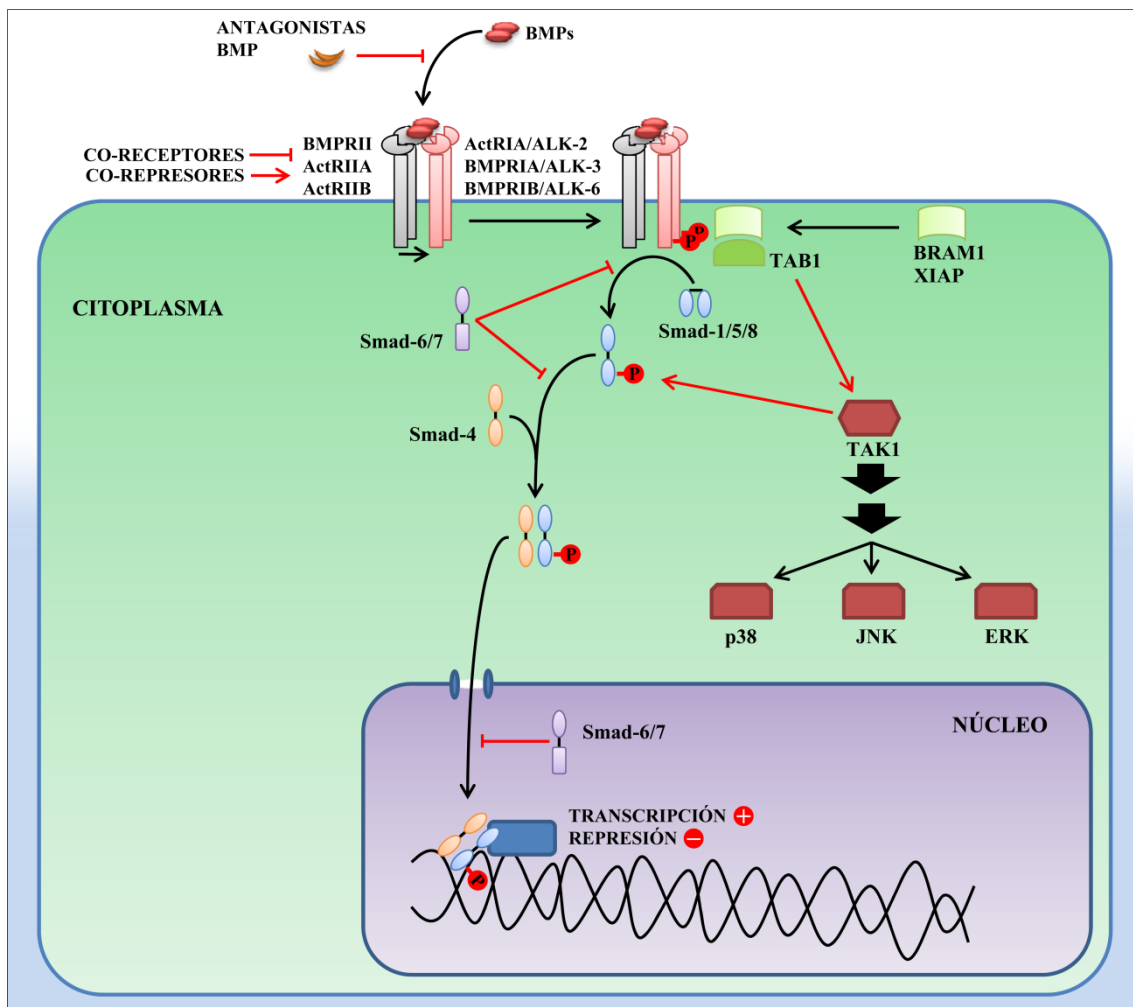


Figura 1. Transducción de la señal BMP. La forma activa de los ligandos BMP se unen a los complejos receptores induciendo la fosforilación de los receptores tipo I a cargo de los receptores tipo II y activando la vía de señalización a través de dos tipos de rutas. La ruta canónica se produce a través de las proteínas Smad. Las BR-Smads (Smad-1/5/8) son fosforiladas por los receptores de BMP tipo I y una vez activas forman complejos con la co-Smad (Smad-4) que son translocados al núcleo donde, junto con proteínas accesorias, inducen o reprimen la transcripción de genes diana. Las proteínas I-Smad regulan negativamente esta vía de señalización por diferentes mecanismos. Alternativamente, las rutas no canónicas de señalización BMP comienzan con el reclutamiento de las proteínas de unión al complejo receptor BRAM1 o XIAP. Estas proteínas atraen a TAB1 que a su vez induce la activación de TAK1, proteína MAPKKK capaz de iniciar diferentes vías de señalización que incluyen a la p38 MAPK, JNK y ERK. Adicionalmente, TAK1 puede inducir la fosforilación de las BR-Smads activando la ruta canónica de señalización BMP.

En cuanto a la transducción de la señal BMP, la ruta canónica se produce a través de las proteínas Smad, que son mediadores comunes para el resto de componentes de la superfamilia TGF- β ¹². Se han identificado ocho proteínas Smad en mamíferos que a su vez pueden clasificarse en tres subclases. El primer grupo lo forman

las Smads reguladas por receptor (R-Smads), de las cuales Smad-1, Smad-5 y Smad-8 son las denominadas BR-Smads, mientras que Smad-2 y Smad-3 son activadas por los receptores de Activina y TGF- β y denominadas por tanto AR-Smads. Las tres BR-Smads presentan una gran semejanza estructural y ninguna diferencia funcional conocida hasta la fecha. La interacción de las R-Smads con el receptor tipo I se produce a través de una región altamente conservada en las BR-Smads (Smad-1/5/8) y en las AR-Smads (Smad-2/3), pero divergente entre ambos grupos¹⁸. Cuando el receptor tipo I se encuentra inactivo, las R-Smads se encuentran en una conformación autoinhibidora. Una vez fosforiladas, la conformación de las R-Smads se modifica permitiendo la formación del oligómero con la co-Smad. La proteína Smad-4 es el único componente del grupo de Smads mediadoras comunes o co-Smads en mamíferos y es compartida por ambas señales BMP y TGF- β /activina. El tercer y último grupo de proteínas Smad lo forman las Smad inhibidoras o I-Smads que, como veremos más adelante, juegan un papel esencial en la regulación de la señalización BMP.

De entre los numerosos genes diana de la vía de señalización BMP, los genes *ID* (*ID1-4*) son inducidos en respuesta a BMP en un gran número de tipos celulares y son factores clave en la regulación de las respuestas biológicas inducidas por las proteínas BMP^{19,20}. Los componentes de la familia de proteínas ID presentan actividades biológicas similares pero no idénticas y participan en una gran variedad de procesos actuando como inhibidores de la transcripción mediante el secuestro de los factores de transcripción bHLH, expresados de forma ubicua. Los factores de transcripción RUNX (*RUNX1-3*), implicados en la hematopoyesis y la osteogénesis entre otros procesos, también han sido intensamente estudiados por su papel como genes diana de la señalización BMP²¹. Es más, las proteínas RUNX pueden interaccionar directamente con las BR-Smads cooperando en la regulación de la transcripción de genes diana inducidos por BMP²². Adicionalmente, los propios componentes de la vía de señalización BMP son a su vez genes diana de esta vía. Más concretamente, se ha descrito la presencia de elementos de respuesta específica a BMP en las regiones promotoras de *Smad6*, *smad7* y *bambi*^{23,24}, lo que indica la existencia de mecanismos intrínsecos para la regulación de la señal inducida en respuesta a ligandos BMP.

Como se ha adelantado anteriormente, además de la vía canónica, varios trabajos han descrito la existencia de rutas no canónicas capaces de transducir la señal inducida

por ligandos BMP de forma Smad independiente (Figura 1). La proteína TAB1 es atraída a los complejos receptores de BMP activados gracias a la actuación de las proteínas BRAM1 y XIAP, capaces de interaccionar directamente con BMPRIA en respuesta a la estimulación con ligandos BMP²⁵⁻²⁷. TAB1 se une y activa a la quinasa TAK1, miembro de la familia de proteínas MAPKKK, que a su vez será la encargada de iniciar rutas de señalización a través de las proteínas MAPK p38, JNK y ERK, entre otras, y de activar en último término al factor de transcripción NF-KB. Asimismo, también se ha descrito que las BR-Smads son susceptibles de ser fosforiladas por TAK1, de forma que el tándem TAB1/TAK1 puede ser necesario para mediar dicha fosforilación a cargo de BMPRIA, lo que hace evidente que ambas vías de señalización pueden estar íntimamente relacionadas^{28,29}. Por otro lado, aunque el modo en que se inician otras vías de señalización no ha sido bien establecido, existen sólidos indicios de que las proteínas BMP también pueden transducir su señal a través de las proteínas PI3K/Akt, y las proteínas quinasas PKA y PKD³⁰⁻³².

Dado que ambos tipos de rutas de señalización BMP pueden co-existir en un mismo tipo celular, varios laboratorios han tratado de identificar los mecanismos que regulan el tipo de vía que será activada. Uno de los mecanismos propuestos se basa en la capacidad de los ligandos BMP para inducir señales distintas en función de su diferente afinidad por complejos receptores de composición variable (Figura 2). De esta forma, un mismo ligando podrá unirse a diferentes complejos receptores, lo que condicionará qué ruta de señalización será activada^{33,34}. En este sistema, la disponibilidad de los distintos ligandos y la batería de receptores y co-receptores que exprese la célula serían factores críticos para el tipo de respuesta generada. Adicionalmente, el laboratorio de la Dra. Knaus y otros laboratorios han aglutinado una serie de evidencias que revelan un mecanismo aparentemente sencillo para la determinación de la ruta de señalización que será activada (Figura 2). Los ligandos BMP pueden unirse a receptores heterotetraméricos presentes en la superficie celular, los cuales se denominan receptores preformados (RPF), o bien inducir la formación de heterotetrámeros a partir de homo o heterodímeros, los cuales se denominan complejos de señalización inducidos por BMP (CSIB). Según ha sido descrito, la activación de los CSIBs o los RPFs va a activar rutas de señalización distintas. Concretamente, la unión del ligando BMP a un RPF induce la endocitosis del complejo receptor vía clatrina e inicia la ruta canónica de señalización por activación de las BR-Smads. Por otro lado, la

transducción de la señal inducida por los CSIBs va a producirse a través de rutas alternativas, principalmente MAPK, y por medio de la endocitosis del complejo receptor vía caveolas³⁵⁻³⁷.

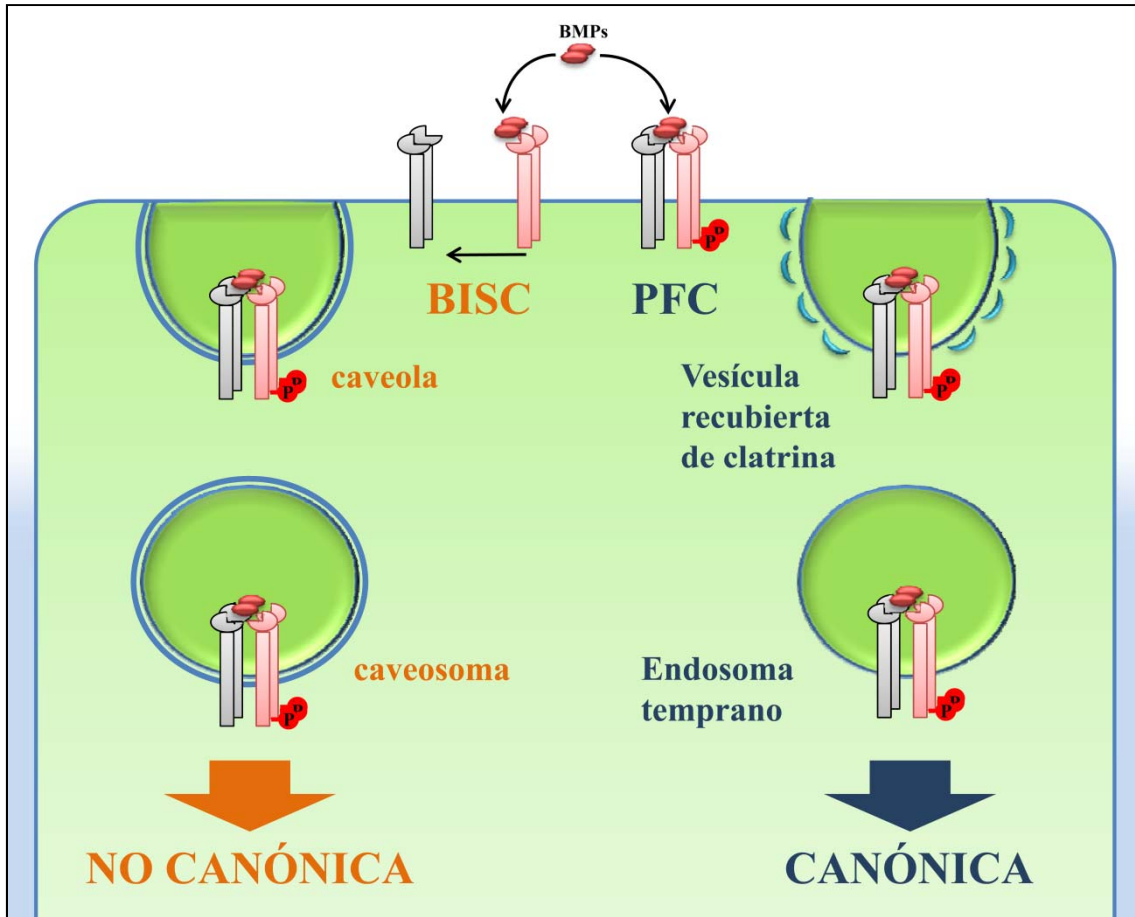


Figura 2. Vías endocíticas del complejo receptor de BMP. Señalización a través de complejos señalizadores inducidos por BMP (BISC): la unión del ligando BMP a su receptor tipo I de alta afinidad induce la oligomerización del complejo receptor, lo que resulta en la internalización dependiente de caveola del complejo y activación de rutas no canónicas (no-Smad) de señalización. Señalización a través de complejos preformados (PFC): el ligando BMP es captado por los PFC constituidos por receptores tipo I y tipo II, lo que inicia la internalización dependiente de clatrina del complejo y promueve el mantenimiento de la señalización BMP a través de las proteínas Smad desde endosomas tempranos.

3. REGULACIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN BMP

El papel esencial de las proteínas BMP durante el desarrollo embrionario ha conllevado sin duda la aparición de numerosos mecanismos dirigidos a controlar de forma muy precisa la acción de estos ligandos. A nivel extracelular, el control sobre la

unión de los ligandos BMP a sus receptores corre a cargo de antagonistas solubles (Figura 1)³⁸⁻⁴¹. Los más de 15 antagonistas extracelulares de BMP conocidos hasta la fecha pueden ser subdivididos en tres grandes grupos: la familia Chordin/Noggin, Twisted gastrulation y la familia Dan/Cerberus. Se trata de factores solubles, normalmente secretados en forma de dímeros, que se caracterizan por su capacidad de unirse a las BMPs bloqueando su unión a los complejos receptores. Su afinidad por los ligandos BMP puede ser muy variable, dándole a este grupo de proteínas un carácter altamente promiscuo. Noggin es uno de los antagonistas de BMP más estudiados, posiblemente a causa de su alta afinidad por los ligandos BMP-2 y BMP-4, aunque baja por BMP-7, y su papel crucial en las primeras fases del desarrollo embrionario⁴². El estudio de Noggin como antagonista modelo ha permitido saber que estas moléculas ejercen su efecto inhibitor mediante la interacción con los mismos dominios del ligando BMP que reconoce el complejo receptor⁴³. No obstante, Noggin también es capaz de inducir respuestas no antagónicas e incluso muy similares a las inducidas por los ligandos BMP⁴⁴, lo cual, sin duda, complica este sistema.

A nivel de membrana celular, la interacción ligando-complejo receptor está sometida a un estrecho control por medio de la actuación de diferentes factores. Aunque los receptores tipo I y tipo II son suficientes para llevar a cabo la señal BMP, su actividad puede ser regulada positivamente por la acción de co-receptores. La familia de proteínas RGM, ancladas a glicosilfosfatidilinositol, que incluye a RGMa, RGMb (también llamada DRAGON) y RGMc (también llamada Hemojuvelina), son co-receptores para BMP-2 y BMP-4 y amplifican la señal BMP mediante la interacción con los receptores tipo I y tipo II⁴⁵. Por otro lado, también ha sido descrito que la proteína transmembrana Endoglin es capaz de unir los ligandos BMP-2 y BMP-7, entre otros miembros de la superfamilia TGF- β , aumentando la respuesta inducida por éstos⁴⁶. Más recientemente, se ha descrito que el receptor de TGF- β tipo III o betaglicano puede actuar como co-receptor de múltiples ligandos BMP, incrementando la fosforilación de Smad-1 en respuesta a éstos⁴⁷.

Además de los diferentes co-receptores para BMP que han sido identificados, también existen una serie de proteínas transmembrana implicadas en la regulación negativa de la señal BMP. BAMBI es un pseudorreceptor estructuralmente relacionado con los receptores tipo I pero que carece del dominio intracelular característico de estos

últimos. Su mecanismo de acción principal es el bloqueo de la unión entre los receptores tipo I y tipo II, modulando negativamente la respuesta a los diferentes miembros de la superfamilia TGF- β ⁴⁸. Además de BAMBI, existen también otras proteínas de membrana con actividad tirosín quinasa capaces de interaccionar con los receptores de BMP regulando negativamente sus funciones. Dentro de este grupo de antagonistas de la señalización BMP se encuentran TrkC, un miembro de la familia de receptores de neurotrofina Trk⁴⁹ y Ror2, miembro de la familia de receptores ROR⁵⁰.

La regulación de la señalización BMP continúa en el interior de la célula gracias en gran medida a la acción del tercer grupo de proteínas Smad, las I-Smads, compuestas por Smad-6 y Smad-7. Mientras que Smad-7 es capaz de inhibir ambas señales BMP y TGF- β /Activina, Smad-6 afecta de forma más específica a la vía de señalización BMP⁵¹. Las I-Smads regulan negativamente la función de las R-Smads y la co-Smad por medio de tres mecanismos distintos (Figura 1): (1) uniéndose a los receptores tipo I e impidiendo la activación de las R-Smads a cargo de éstos⁵²; (2) compitiendo con la co-Smad por formar oligómeros con las R-Smads⁵³; y (3) a nivel nuclear, uniéndose al ADN en secuencias de respuesta a Smads e impidiendo, de esta forma, la formación de complejos ADN-Smad funcionales que son inducidos por la estimulación con ligandos BMP⁵⁴. Alternativamente, las I-Smads pueden mediar la unión de la proteína Smurf1 a los receptores de BMP tipo I promoviendo la degradación del complejo receptor mediante poliubiquitinación⁵³. Smurf1 y Smurf2 pertenecen al grupo de ligasas de ubiquitina E3 tipo EHCT y son consideradas elementos reguladores de la señalización BMP dada su capacidad para poliubiquitinar a Smad-1 y Smad-5 induciendo su degradación vía proteosoma de forma directa e independientemente al estado de activación de las BR-Smads^{55,56}.

4. FUNCIÓN DE LAS BMPs

La capacidad para inducir la formación ectópica de hueso y cartílago que propició el descubrimiento de las proteínas BMP ha pasado a ser, con el paso de los años, la punta del iceberg de las múltiples funciones que pueden atribuirse a esta familia de morfógenos. Durante la embriogénesis de mamíferos, las proteínas BMP participan activamente en procesos esenciales que incluyen la determinación de la asimetría

derecha-izquierda, del patrón neuronal y esquelético, la formación de extremidades y la organogénesis. Así pues, defectos en la vía de señalización BMP afectan al desarrollo de dientes, riñón, piel, pelo, músculo, sistema neuronal y a la hematopoyesis⁵⁷. De hecho, ratones que no expresan *Bmp-2* y/o *Bmp-4*, al igual que los que no expresan los genes *Bmpr1a* y *Bmpr1b*, mueren entre los días 6,5 y 9,5 *postcoitum* a causa de defectos en la gastrulación y formación del mesodermo⁵⁸⁻⁶⁰.

En conjunto, estos estudios demuestran que las proteínas BMP son esenciales para el correcto desarrollo y la homeostasis de un gran número de órganos y sistemas en la fase embrionaria y post-natal. Por lo tanto, no es ninguna sorpresa que un gran número de patologías de origen variable hayan sido asociadas a defectos en la vía de señalización BMP. Además de desórdenes que afectan al hueso, como la fibrodysplasia osificante progresiva⁶¹, y articulaciones, como la artritis reumatoide y osteoartritis⁶², también se ha descrito que las BMPs participan en enfermedades no relacionadas con el esqueleto que incluyen a la esclerosis múltiple⁶³, inflamación de las vías respiratorias⁶⁴ y enfermedades vasculares^{65,66}. Igualmente, los componentes de la familia de proteínas BMP han sido relacionados con la predisposición a determinados tipos de cáncer y su expresión aberrante se ha descrito en diversos tipos de tumores como es el caso de melanomas, cáncer gástrico, cáncer de células basales y de células renales y diferentes tipos de carcinomas que incluyen el de células escamosas en cuello y cabeza⁶⁷.

Aparte del empleo de organismos mutantes, el estudio de las funciones de la vía BMP ha experimentado grandes avances gracias al empleo de pequeñas moléculas inhibidoras. La dorsomorfina (DM), definida como un inhibidor específico de la vía canónica de señalización BMP que impide la fosforilación de Smad-1, -5 y -8 a cargo de los receptores para BMP tipo I ALK-2/ActRIA, ALK-3/BMPRIA y ALK-6/BMPRIB, fue descrita por primera vez en 2008 por Yu y colaboradores⁶⁸. Su capacidad para bloquear la vía de señalización BMP ha llevado a la realización de un número considerable de trabajos usando este compuesto. Además de la DM, varios compuestos han visto la luz en los últimos años gracias al esfuerzo de los investigadores por buscar moléculas inhibidoras con mayor eficacia y especificidad. Entre estos compuestos podemos encontrar a LDN-193189⁶⁹ y DMH1⁷⁰.

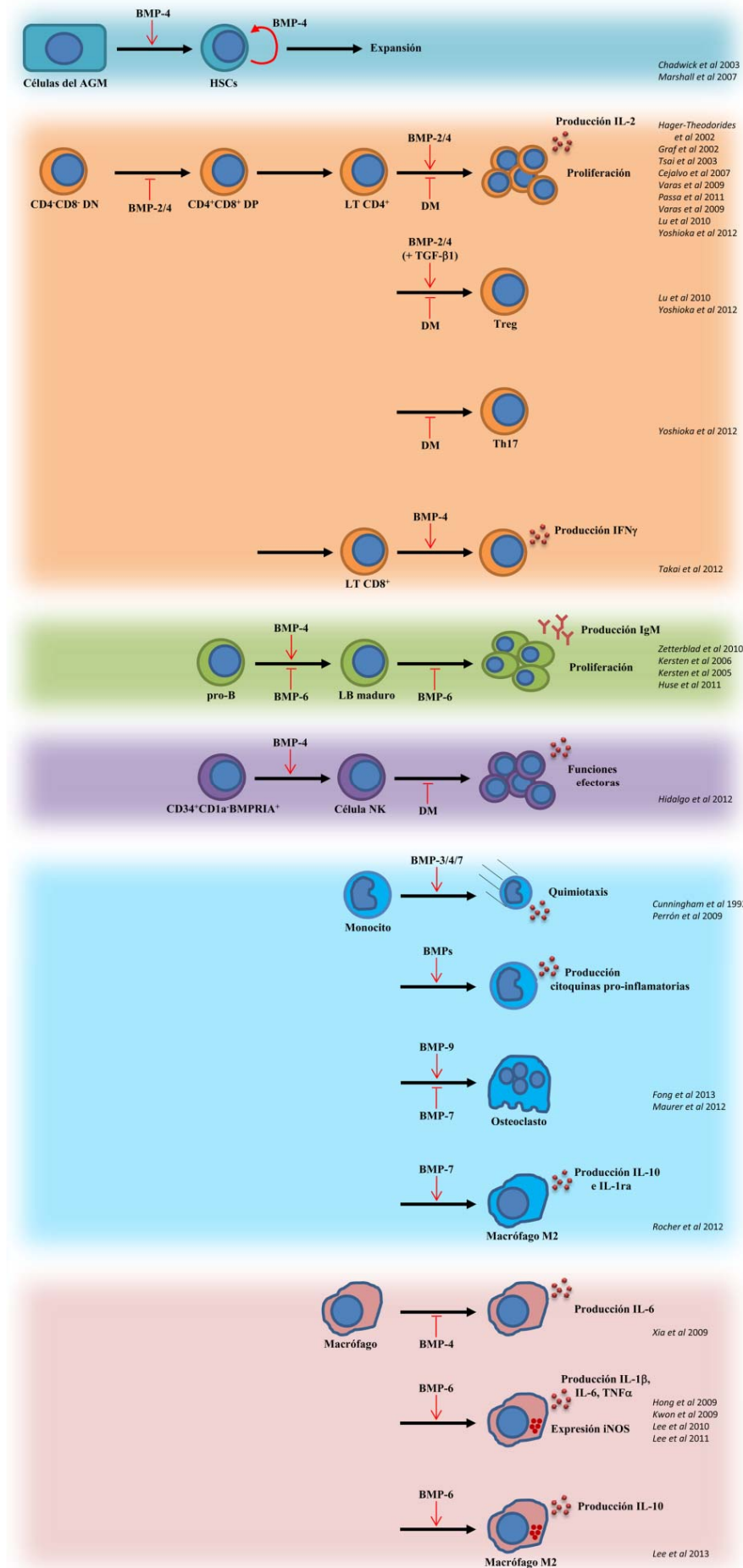


Figura 3. Función de las proteínas BMP en células del sistema inmunitario.

Resumen esquemático de los estudios publicados en relación a la función de los ligandos BMP en diferentes tipos celulares del sistema inmunitario. (AGM) aorta-gonadal-mesonefros; (HST) célula madre hematopoyética; (DN) doble negativo; (DP) doble positivo; (LT) linfocito T; (DM) dorsomorfina; (LB) linfocito B;

4.1 Función de las proteínas BMP en el Sistema Inmunitario

La relación de las proteínas BMP con el sistema hematopoyético podría definirse como muy primitiva, siempre y cuando se hable de esta relación en términos ontogénicos⁷¹. Concretamente, BMP-4 ha sido descrito por su implicación en la diferenciación de células madre hematopoyéticas (HSC) durante el desarrollo embrionario humano⁷², así como en el mantenimiento de la multipotencia de los progenitores hematopoyéticos (Figura 3)^{73,74}. Dado el importante papel que la vía de señalización BMP desempeña durante las fases más tempranas de la hematopoyesis, no es de extrañar que este grupo de proteínas siga actuando en fases más tardías de procesos de diferenciación e incluso, como veremos a continuación, en el estadio maduro de diferentes poblaciones de células sanguíneas (Figura 3).

4.1.1 Proteínas BMP y linfocitos T

Un considerable número de trabajos han establecido la función de las proteínas BMP durante la diferenciación de los precursores intratímicos hacia células T maduras. De forma resumida, BMP-2 y BMP-4 son producidos tanto por el estroma tímico como por los precursores intratímicos CD34⁺, que también expresan los receptores de BMP y las proteínas Smad. La activación de la vía de señalización BMP en los precursores intratímicos promueve su mantenimiento en un estadio inmaduro, mediante un incremento en la supervivencia y la disminución de la proliferación contrarrestando los efectos de IL-7. Asimismo, la vía BMP bloquea la diferenciación de estas células hacia células T afectando principalmente a la transición de timocitos CD4⁻CD8⁻ dobles negativos a CD4⁺CD8⁺ dobles positivos⁷⁵⁻⁸⁰.

En lo que se refiere a las células T maduras, se ha descrito que los linfocitos T CD4⁺ de ganglio linfático de ratón incrementan la expresión de los receptores de BMP en respuesta a la estimulación vía TCR/CD28⁸¹, y que la adición de BMP-2 y BMP-4 tiene efectos contrarios sobre la proliferación de estas células. En esta misma línea, se ha descrito que el primado de células T CD4⁺ de ratón en presencia de BMP-2 y BMP-4 incrementa su respuesta proliferativa ante una segunda re-estimulación⁸², y que el ligando BMP-6 afecta negativamente a la proliferación basal de la línea celular Jurkat T⁸³. Otros trabajos se han centrado en analizar el posible papel de los ligandos BMP en la regulación de las funciones efectoras de los linfocitos T. Por un lado, BMP-4 parece

incrementar la producción de IFN γ por células T CD8⁺ durante la presentación antigénica⁸⁴, y, por otro lado, se ha descrito que los ligandos BMP-2 y BMP-4 pueden actuar de forma sinérgica junto con TGF- β 1 en la diferenciación de los linfocitos T reguladores⁸². Más recientemente, se ha descrito que la inhibición de la vía canónica de señalización BMP durante la activación vía TCR/CD28 de los linfocitos T CD4⁺ de ratón reduce su respuesta proliferativa. En este trabajo pudo observarse igualmente que la inhibición de la vía BMP durante el proceso de activación también afecta negativamente a la producción de IL-2 y expresión de CD25 y a la diferenciación de las células T hacia Th17 y Treg sin afectar significativamente a la generación de células Th1 y Th2⁸⁵.

4.1.2 Proteínas BMP y linfocitos B

Siguiendo con el linaje linfoide, la familia de proteínas BMP también ha sido implicada en la diferenciación de los linfocitos B de forma diferencial según el ligando estudiado. Mientras que BMP-4 parece promover la generación de células B, BMP-6 la estaría inhibiendo, siendo ambos resultados derivados de estudios *in vitro*^{86,87}. En el estadio maduro, la presencia de BMP-6 durante la activación de células B tanto vírgenes como de memoria inhibe su proliferación y diferenciación hacia células plasmáticas productoras de IgM^{88,89}. También se ha descrito que estas células expresan *BMP6* a consecuencia de su activación, por lo que la estimulación autocrina/paracrina de la vía de señalización BMP podría actuar como un elemento regulador de la activación de los linfocitos B. Sin embargo, un trabajo posterior muestra cómo linfocitos B deficientes para Twisted Gastrulation, antagonista soluble de BMP, desarrollan una respuesta hiperproliferativa e hipo-apoptótica al ser estimulados vía TLR-4 o BCR⁹⁰, lo que sugiere que otros factores podrían estar condicionando la respuesta de los linfocitos B a la estimulación con ligandos BMP.

4.1.3 Proteínas BMP y células NK

Las células NK son sin duda uno de los tipos celulares del sistema inmunitario cuya relación con las proteínas BMP ha sido menos explorada. En 2012, nuestro laboratorio publicó un trabajo que demostraba que la expresión del receptor BMPRIA en precursores intratímicos CD34⁺CD1a⁻ es un marcador de compromiso con el linaje NK⁹¹. Estos precursores diferencian mayoritariamente a células NK CD56⁺ funcionales al ser cultivadas tanto con células estromales tímicas en cultivos quiméricos humano-

ratón como en cultivos en suspensión en presencia de SCF e IL-15. En ambos sistemas, la vía de señalización BMP se activa de forma autocrina/paracrina en las células en diferenciación, siendo necesaria para la regulación de la expresión de factores de transcripción relacionados con linaje NK y de CD122, componente del receptor de IL-15. Al igual que sucede en otros tipos celulares, el papel de las BMPs no se restringe al proceso de diferenciación de las células NK. Las proteínas BMP también participarían como mediadoras en la adquisición de las características efectoras de las células NK intratímicas⁹¹ y datos de nuestro grupo indican que también de las presentes en sangre periférica.

4.1.4 Proteínas BMP y monocitos

La expresión de los componentes de la vía de señalización BMP en monocitos o líneas celulares monocíticas ha sido descrita en varias ocasiones^{33,92-94}. Sin embargo, el papel de las proteínas BMP en diferentes aspectos de la biología de estas células difiere de forma considerable en función del ligando estudiado y el efecto analizado. Así, se ha descrito que BMP-9 promueve la diferenciación de los monocitos hacia osteoclastos, mientras que BMP-7 muestra un efecto inhibitor sobre este proceso^{95,96}. En cuanto a aspectos funcionales de los monocitos, un primer trabajo demostró la capacidad de BMP-4 y BMP-3 para atraer a monocitos BMPRIA⁺ desde el torrente sanguíneo hacia lugares donde se ha realizado un implante subcutáneo de matriz ósea⁹². El efecto quimiotáctico de las BMPs sobre los monocitos, en este caso la línea monocítica THP-1, fue extendido al ligando BMP-7 en un posterior trabajo³³. Usando esa misma línea celular, otros autores han descrito recientemente que su tratamiento con BMP-7 promueve la aparición de células con características inmunosupresoras, lo que sugiere que BMP-7 podría inducir la diferenciación de monocitos hacia macrófagos tipo M2⁹⁴.

4.1.5 Proteínas BMP y macrófagos

Continuando con células fagocíticas, se ha descrito que los macrófagos expresan los receptores BMPRII, ActRIIA, ActRIIB, ALK-2 y ALK-3 en reposo, aunque son BMPRII y ALK-2 los principales implicados en otorgar a estas células la capacidad para responder a ligandos BMP⁹³. Asimismo, los macrófagos son capaces de producir ligandos BMP en respuesta a diferentes estímulos^{97,98}. En relación a su función, BMP-2 y BMP-4 han sido implicados en el control de la expresión del regulador de absorción de hierro y péptido antimicrobiano hepcidina⁹⁹. Las proteínas BMP también regulan la

producción de citoquinas por parte de los macrófagos, ya que BMP-4 parece tener un efecto negativo sobre la producción de IL-6 sin afectar a la de IL-1 β y TNF α ¹⁰⁰, mientras que BMP-6 induce la expresión de IL-1 β , IL-6, TNF α e iNOS en líneas celulares de macrófagos al igual que en cultivos primarios de macrófagos peritoneales de ratón^{93,101-103}.

4.1.6 Proteínas BMP y células dendríticas (DCs)

Hasta la publicación del estudio llevado a cabo por nuestro laboratorio cuyos resultados forman parte del presente trabajo¹⁰⁴, muy poco se conocía de la función de las proteínas BMP en la biología de las DCs. Básicamente dos son los trabajos publicados previamente a nuestro estudio. Uno de ellos muestra que la presencia de BMP-4 durante la activación inducida por LPS de las DCs derivadas de medula ósea de ratón afecta negativamente al incremento en la expresión de CD80, CD86 y MHC-II. Este efecto estaría mediado a través de p38 MAPK y de Erk1/2, y de forma independiente a Smad-1/5/8¹⁰⁵. El segundo trabajo muestra la expresión de diferentes componentes de la vía de señalización BMP en las DCs derivadas de monocitos (MoDCs) de individuos sanos y de pacientes afectados de anemia de células falciformes con complicaciones ortopédicas¹⁰⁶.

5. CÉLULAS DENDRÍTICAS (DCs)

Desde su descubrimiento hace ya casi 40 años a cargo de los Drs. Ralph Steinman y Zannvil Cohn^{107,108}, el papel central de las DCs en la respuesta adaptativa a antígenos extraños y en la inducción de tolerancia a antígenos propios e inocuos es un hecho indiscutible y ampliamente probado. Las DCs pueden ser definidas como células centinela del sistema inmunitario cuyo principal objetivo es el de inspeccionar los diferentes tejidos del organismo e instruir al sistema inmunitario adaptativo en la respuesta frente antígenos periféricos¹⁰⁹. Dos grandes subpoblaciones de DCs pueden ser definidas en base a su desarrollo ontogénico y funcionalidad¹¹⁰: las DCs plasmacitoides (pDCs) y las DCs convencionales o clásicas (cDCs).

5.1 DCs plasmacitoides

Inicialmente caracterizadas como una población leucocitaria con funciones especiales^{111,112}, las pDCs no fueron definidas como una población de DCs hasta la aparición de los trabajos de Siegal y col.¹¹³ y Cella y col.¹¹⁴ y gracias, en gran medida, a la capacidad de estas células para producir grandes cantidades de IFN tipo I en respuesta a la mayoría de los virus. En estado inmaduro o de reposo, las pDCs se caracterizan por una baja expresión de MHC-II, de moléculas co-estimuladoras y de la integrina CD11c. Más recientemente, las pDCs humanas han sido definidas según la expresión diferencial de una serie de marcadores de superficie como células Lin⁻MHC-II⁺CD303(BDCA-2)⁺CD304(BDCA-4)⁺ (¹¹⁵; revisado en¹¹⁶). Las pDCs comparten origen con las cDCs, también se acumulan en sangre y tejidos periféricos e igualmente son capaces de presentar antígenos a células T una vez activadas. Sin embargo, tienen un ciclo vital distinto al de las cDCs y el repertorio de PRRs que expresan es más limitado e incluye a TLR-7 y TLR-9. Aunque clásicamente se ha asumido que las pDCs no están capacitadas para realizar presentación antigénica cruzada, existen trabajos que muestran su participación ya sea directa¹¹⁷ o indirectamente¹¹⁸ en el primado de células T CD8⁺ frente a antígenos fagocitados.

5.2 DCs convencionales

Las cDCs son un subtipo de DCs presentes en tejidos linfoides y no linfoides, incluyendo la sangre. Se caracterizan por tener una capacidad superior para primar a las células T vírgenes frente a antígenos presentes en el microambiente o asociados a células y por ser las principales células productoras de IL-12. Presentan una serie de propiedades responsables de las funciones que llevan a cabo:

1.- Su amplia distribución en los tejidos no linfoides y su localización en la zona marginal del bazo y diferentes áreas de los ganglios linfáticos les confiere una ventaja excepcional en cuanto al acceso a antígenos tisulares y sanguíneos^{119,120}.

2.- Poseen una maquinaria prodigiosa para el procesamiento y la presentación de antígenos¹²¹ que además contribuye a la extraordinaria capacidad de algunas subpoblaciones de realizar presentación cruzada vía MHC-I de antígenos endocitados¹²².

3.- Una vez cargadas con los antígenos capturados, son capaces de migrar a las zonas T de los órganos linfoides ya sea en estado normal o inflamado^{123,124}.

4.- El proceso migratorio conlleva normalmente un cambio dramático en las características fenotípicas y efectoras de las DCs^{125,126}. Este fenómeno se conoce como maduración y, como se ha dicho anteriormente, dota a las DCs de una habilidad superior para primar células T vírgenes.

La definición fenotípica de las cDCs y de sus subpoblaciones está en constante evolución gracias al acceso de los investigadores a técnicas cada vez más sofisticadas. En el caso humano, las cDCs presentes en sangre son definidas de forma general como células Lin⁻MHC-II⁺CD11c⁺ y pueden ser a su vez subdivididas en dos poblaciones¹²⁷: CD1c (BDCA-1)⁺, que son las mayoritarias; y CD141 (BDCA-3)⁺, en una proporción menor. No obstante, se ha descrito que estas poblaciones y otras funcionalmente relacionadas pueden ser encontradas tanto en tejidos linfoides como no linfoides, aunque con diferente caracterización fenotípica¹²⁸⁻¹³⁰.

6. FUNCIONALIDAD DE LAS DCs

Como ya se ha comentado, la capacidad de las DCs para generar una respuesta inmunitaria adaptativa va a depender principalmente de su habilidad para primar y activar a las células T vírgenes. Los antígenos han de ser procesados por las DCs en péptidos de menor tamaño y presentados a células T gracias a la formación de la sinapsis inmunológica entre ambos tipos celulares¹³¹. Es precisamente en esta sinapsis en la que se van a proporcionar una serie de señales que van a resultar en la activación, expansión y adquisición de las funciones efectoras de las células T (Figura 4). La primera señal, o señal 1, consiste en la unión del TCR expresado en la superficie de las células T al complejo MHC-péptido presente en la membrana celular de las DCs. Esta unión es necesaria pero no suficiente para la activación de las células T, puesto que la activación eficiente de estas células requiere el aporte de señales adicionales¹³². Estas señales secundarias son denominadas de forma general señales co-estimuladoras, se engloban en lo que se considera la señal 2 y están constituidas por una compleja red de pares receptor/ligando transmembrana. Adicionalmente, una señal 3 en forma de factores solubles, como IL-12 e IL-1 entre otros, va a participar también en la activación

y diferenciación de los linfocitos T vírgenes¹³³. Es el balance entre todas estas señales el que designa el tipo de respuesta que va a generarse frente a un determinado antígeno. Notablemente en contraste con lo que ocurre con los linfocitos T vírgenes, la activación de los linfocitos T de memoria es más bien independiente de la señal 2, lo que asegura una rápida ejecución de las funciones efectoras de estas células ante el re-encuentro con el antígeno^{134,135}.

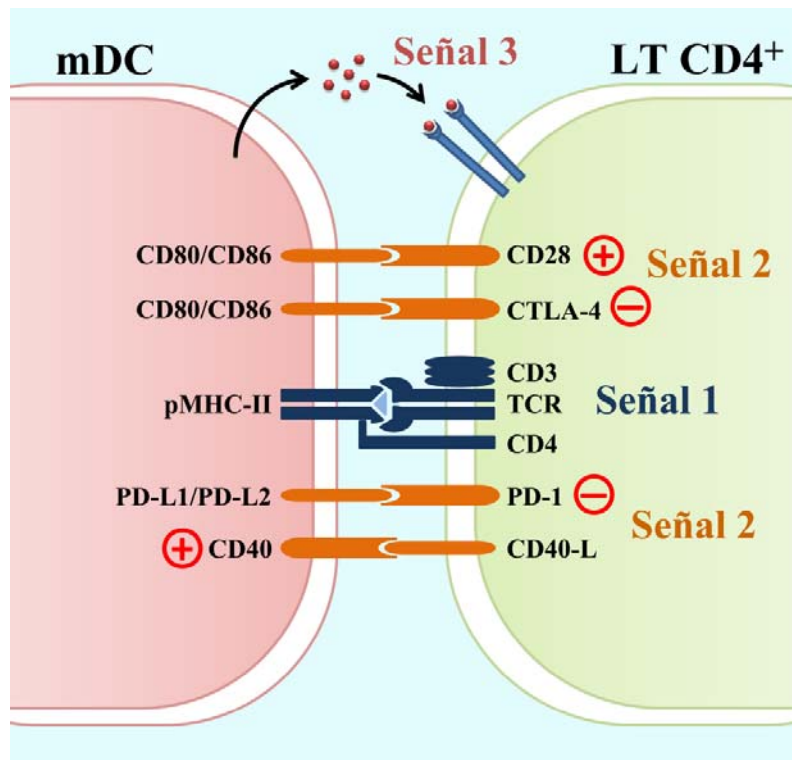


Figura 4. Modelo de las 3 señales en la interacción mDC-linfocito T CD4⁺. El reconocimiento del complejo pMHC-II por el TCR y la molécula CD4 expresados por el linfocito T y su posterior unión constituyen la denominada señal 1. La señal 2 o señal co-estimuladora se compone de una compleja red de pares ligando/receptor cuya unión puede enviar tanto señales negativas como positivas creando un balance del que dependerá en gran medida la respuesta desencadenada. Por último, la señal 3 se produce a través de factores solubles y participa en la activación del linfocito T, al igual que en su diferenciación hacia célula efectora.

Las señales de co-estimulación enviadas por las DCs a las células T vírgenes van a poder ser de dos tipos en base a su función: activadoras, si promueven la activación de las células T, su supervivencia y diferenciación, e inhibidoras, si antagonizan las señales vía TCR suprimiendo la activación de las células T. El patrón de expresión de las diferentes moléculas co-estimuladoras va a determinar en gran medida el carácter inmunogénico o tolerogénico de las DCs, siendo el ratio entre señales activadoras e

inhibidoras un factor determinante, por encima de la presencia o ausencia de una molécula co-estimuladora en concreto. En base a su composición estructural, las moléculas co-estimuladoras pueden ser clasificadas en 4 grupos distintos¹³⁶: (1) Miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas o de la familia B7; (2) Miembros de la familia de receptores de TNF (TNFR); (3) Moléculas de adhesión celular e integrinas; y (4) Moléculas con dominio inmunoglobulina y mucina de células T (TIM). De estos 4 grupos, los componentes de las familias B7 y TNFR son probablemente los mejor caracterizados.

Empezando por la familia B7, las moléculas CD80 y CD86 expresadas en DCs han sido extensamente estudiadas por su importante papel en la activación de los linfocitos T¹³⁷. La unión a uno de sus ligandos, CD28, promueve la producción de IL-2 y la supervivencia en las células T e inhibe la diferenciación hacia células T reguladoras¹³⁸⁻¹⁴⁰. Estas mismas moléculas juegan un papel dual en la activación de las células T, puesto que la unión a su ligando de mayor afinidad CTLA-4¹⁴¹, expresado por células T activadas, contrarresta la señalización a través de TCR y CD28^{142,143}.

La proteína de membrana PD-1 se expresa en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, en células NK, células NKT y en linfocitos B activados^{144,145}. De los dos ligandos de PD-1, PD-L1/B7-H1 se expresa de forma constitutiva en las DCs y en otras células inmunitarias y no inmunitarias¹⁴⁶. Su expresión en DCs se incrementa en respuesta a diferentes estímulos, al igual que la de PD-L2/B7-DC, el otro ligando de PD-1 cuya expresión es también inducible en APCs que incluyen a linfocitos B, macrófagos y DCs¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. La unión de PD-L1 y PD-L2 a su ligando PD-1 en linfocitos T CD4⁺ bloquea la señalización vía TCR/CD28 a través del reclutamiento de la fosfatasa SHP-2¹⁵⁰, siendo mayor este efecto cuando la estimulación antigénica es baja o limitante¹⁵¹. De esta forma, la expresión de los PD-Ls por las DCs modula negativamente la activación de las células T inhibiendo la entrada en ciclo celular y reduciendo la producción de citoquinas por estas células.

CD40 es otra de las molécula co-estimuladoras mejor caracterizadas y miembro destacado de la familia TNFR¹⁵². Su expresión ha sido descrita en tipos celulares no hematopoyéticos, como células epiteliales y endoteliales, y en células del sistema inmunitario, que incluyen a las APCs. El ligando natural de CD40, CD40-ligando o

CD40-L (CD154), se expresa en células T activadas, mayoritariamente linfocitos T CD4⁺, basófilos y eosinófilos y células musculares lisas¹⁵³. La activación del TCR induce la expresión de CD40-L por las células T y su polarización hacia la sinapsis inmunológica, donde promueve la activación a través de la unión a su receptor CD40¹⁵⁴.

Además de estos destacados miembros, la lista de moléculas implicadas en la comunicación entre DCs y células T es larga y en ella se pueden encontrar parejas de gran relevancia como son ICOS/ICOS-L, 4-1BB/4-1BB-L; OX40/OX40-L; CD27/CD70 y LFA-1/ICAM-1/2/3¹⁵⁵. La complejidad de la regulación de la activación de los linfocitos T a cargo de las DCs es indicativo de la necesidad de un control estrecho de las funciones de los linfocitos T para asegurar la respuesta protectora frente a patógenos y, a la vez, limitar el posible daño que esta respuesta pueda ocasionar sobre los tejidos del propio organismo.

7. CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONOCITOS (MoDCs) Y VACUNAS TERAPÉUTICAS

En 1993 fue demostrada la posibilidad de generar DCs *in vitro* a partir de monocitos de sangre periférica humana¹⁵⁶, fenómeno que también ha sido descrito *in vivo* principalmente en ratón¹⁵⁷. Desde entonces, este modelo de diferenciación *in vitro* de las MoDCs ha supuesto una plataforma ideal para la obtención de grandes cantidades de DCs, lo cual ha permitido llevar a cabo avances muy significativos en el conocimiento de la biología de estas células. Dos años después, fue propuesto por primera vez el empleo de DCs para la elaboración de vacunas terapéuticas diseñadas para el tratamiento de diferentes enfermedades y, especialmente, de procesos cancerosos (Figura 5)¹⁵⁸. Casi 20 años después, múltiples estudios enfocados a evaluar la eficacia terapéutica de las DCs han podido concluir que las vacunas con DCs son seguras y que pueden inducir la expansión de células T CD4⁺ y CD8⁺ específicas contra el antígeno tumoral¹⁵⁹. De hecho, en la actualidad dos ensayos clínicos en fase III se están llevando a cabo con vacunas basadas en MoDCs como tratamiento adicional al cuidado estándar post-quirúrgico y en combinación con los tratamientos radio y quimioterapéuticos ya existentes (identificadores de los ensayos clínicos: NCT00045968 y NCT01582672). Sin embargo, siguen existiendo discrepancias considerables entre la respuesta

inmunitaria y la respuesta clínica del paciente. Las posibles causas para esta falta de eficacia pueden encontrarse en la capacidad del tumor y del microambiente tumoral para evadir la respuesta inmunitaria¹⁶⁰. Consecuentemente, la manipulación de las DCs con el objetivo de mejorar sus características inmunogénicas sigue siendo una estrategia muy atractiva para el desarrollo de vacunas con mayor eficacia terapéutica.

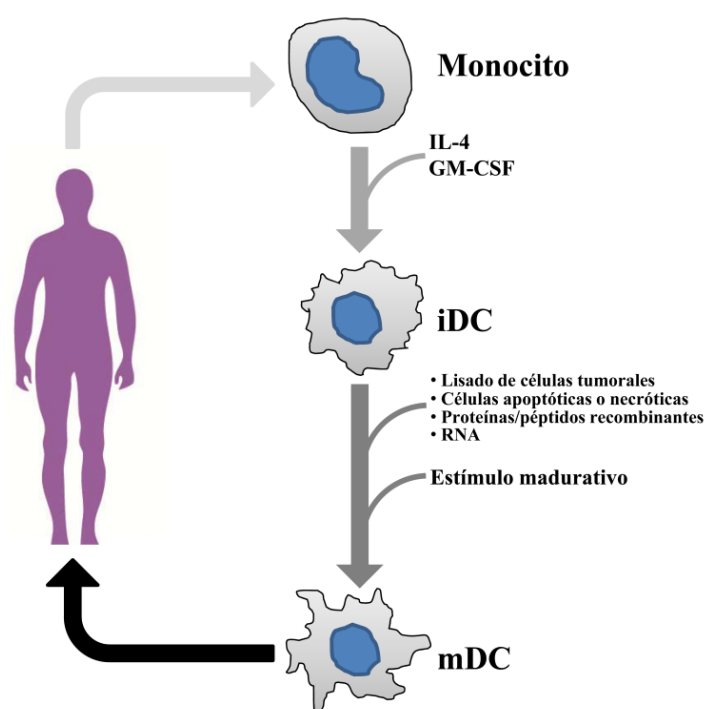


Figura 5. Vacunas terapéuticas basadas en DCs para el tratamiento de procesos tumorales. Tras su asilamiento a partir de muestras de sangre periférica, los monocitos son cultivados a lo largo de 6 días en presencia de IL-4 y GM-CSF para promover la diferenciación hacia iDCs. Las iDCs son cargadas con alguno de los diferentes productos antigénicos derivados del tumor y maduras por adición de un estímulo que actúa como adyuvante. Las mDCs cargadas con el antígeno y con un perfil inmunogénico son re-infundidas al paciente donde para iniciar la respuesta inmunitaria adaptativa contra el antígeno tumoral.

En este sentido, son muchos los acercamientos que se han desarrollado en este campo. Entre otros, la búsqueda de adyuvantes con mayor potencial para estimular a las DCs, el refinado de los métodos empleados para promover la captación y presentación de los antígenos tumorales por las DCs, y la exploración de diferentes rutas de administración de las DCs generadas *in vitro* que mejoren su acceso a las áreas T de los órganos linfoides secundarios^{161,162}.

En relación a la capacidad de las DCs para inducir la respuesta inmunitaria, se ha demostrado el potencial terapéutico derivado del bloqueo en las DCs de la expresión de moléculas inhibitoras como es el caso de SOCS1¹⁶³ e IDO¹⁶⁴. Por otro lado, muchos laboratorios han volcado sus esfuerzos en el estudio de estrategias para desequilibrar el balance de las señales implicadas en la co-estimulación o "señal 2" a favor de un perfil más activador o inmunogénico. Las evidencias acumuladas en torno al potencial antitumoral del uso de anticuerpos bloqueantes contra moléculas de carácter inmunosupresor, como PD-1¹⁶⁵ y CTLA-4¹⁶⁶, junto con los progresos en el campo de la ingeniería genética, han permitido el desarrollo de técnicas más sofisticadas que apenas han comenzado a ser explotadas¹⁶⁷. Así, un interesante trabajo demuestra que la generación de DCs humanas genéticamente modificadas para la expresión de anticuerpos anti-CTLA-4 incrementa la respuesta citolítica antitumoral *in vitro*¹⁶⁸. También por medio de técnicas de transfección, el silenciamiento de la expresión de PD-L1 y PD-L2 en DCs humanas incrementa notablemente su capacidad para generar una respuesta antígeno-específica *ex vivo* en linfocitos T CD8⁺¹⁶⁹.

Por último, a pesar de que la mayoría de trabajos que estudian las vacunas basadas en DCs han puesto su atención en la respuesta de las células T, cada vez son más los investigadores que sugieren la participación de otros tipos celulares y, más concretamente, de las células NK en la generación de la respuesta antitumoral¹⁷⁰. Por lo tanto, evaluar la competencia de las DCs generadas *in vitro* para estimular a las células NK podría tener un valor añadido a la hora de evaluar la eficacia de nuevas vacunas diseñadas para inmunoterapia.

OBJETIVOS

El estudio de la posible implicación de vías de señalización aún no relacionadas con la biología de las DCs puede aportar no solo un mayor conocimiento de estas células, si no también posibles estrategias para la manipulación de las DCs con el objetivo de mejorar sus características inmunogénicas o tolerogénicas. Por otro lado, la literatura existente hace evidente que las proteínas de la familia BMP cumplen una serie de funciones en diferentes tipos celulares pertenecientes al sistema inmunitario. Aunque algunos trabajos evidencian posibles funciones de las proteínas BMP en las DCs humanas, bien es cierto que este campo no ha sido estudiado en profundidad hasta la fecha.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo será el de estudiar la implicación de la vía de señalización BMP en la diferenciación y maduración de las MoDCs humanas y en su interacción con los linfocitos T CD4⁺ vírgenes. Concretamente analizaremos:

1. La expresión de los componentes de la vía canónica de señalización BMP y su funcionalidad en iDCs y mDCs.
2. La respuesta de las iDCs a la activación de la vía de señalización BMP, analizando el efecto sobre su supervivencia, fenotipo y características funcionales.
3. La producción de ligandos BMP por las DCs en respuesta a diferentes estímulos madurativos.
4. La activación de la señalización BMP autocrina/paracrina por la vía canónica durante la maduración de las DCs y el efecto de su bloqueo sobre la funcionalidad de las mDCs.
5. La capacidad de los linfocitos T CD4⁺ de responder a las proteínas BMP y el papel de esta vía de señalización en la adquisición de funciones efectoras en los linfocitos a consecuencia de su interacción con mDCs.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Obtención de muestras humanas

En el desarrollo del presente trabajo se han empleado *buffy coats* obtenidos a partir del procesado de muestras de sangre periférica de donantes sanos en el Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid. Adicionalmente, muestras de sangre periférica de pacientes a los que se les había realizado trasplante de médula ósea fueron obtenidas a través del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús (Madrid). Todos los tipos de muestras humanas utilizadas en este trabajo se usaron garantizando el anonimato de los donantes y de acuerdo a las exigencias del comité ético de investigación clínica del Hospital Clínico San Carlos.

2. Generación y cultivo de MoDCs

A partir de concentrados leucocitarios en suspensión de donantes sanos, se obtuvieron las células mononucleares mediante centrifugación en gradiente de densidad (Lymphocyte Isolation Solution, Rafer, Madrid, España). En los casos indicados estas células fueron empleadas para la realización de estudios por citometría de flujo. Seguidamente, se llevó a cabo el aislamiento de los monocitos mediante selección positiva por métodos inmunomagnéticos usando el kit específico CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las células CD14⁺ purificadas fueron cultivadas a una concentración de 10⁶ cél/ml en medio AIM-V libre de suero (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EEUU) suplementado con 1mM de L-glutamina (Sigma-España) y 20 ng/ml de GM-CSF más 20 ng/ml de IL-4 (ambas citoquinas de Invitrogen). Estos cultivos se llevaron a cabo en placas de 24 o 48 pocillos de fondo plano, en un incubador a 37°C, en una atmósfera húmeda y al 5% de CO₂. En los días 2 y 4 del cultivo se reemplazó la mitad del medio de cultivo por medio fresco con la misma concentración de GM-CSF e IL-4. Tras 6 días de diferenciación, se obtuvieron iDCs definidas como CD14⁻CD1a^{+/+}DR^{low}. En los experimentos donde se indica, el cóctel de diferenciación para generar MoDCs fue suplementado con BMP-4 (Humanzyme Inc., Chicago, EEUU) a las concentraciones de 1, 10 y 100 ng/ml, y fue igualmente repuesto los días correspondientes a lo largo de la diferenciación.

Para la maduración de las iDCs el 20% del volumen total de cada pocillo fue reemplazado por medio fresco suplementado con un cóctel de citoquinas pro-

inflamatorias compuesto por 10 ng/ml de IL-1 β , 15 ng/ml de IL-6, 10 ng/ml TNF α (todas de Invitrogen) y 1 μ g/ml de PGE2 (Sigma-España). Las mDCs fueron generadas de forma estándar tras 36 horas de estimulación y definidas como células DR^{high}CD86⁺CD83⁺. Alternativamente, iDCs fueron maduras con el cóctel de citoquinas ya descrito suplementado con 50 ng/ml de BMP-4. En los casos en que es indicado, el estímulo de madurativo fue el cóctel de citoquinas pro-inflamatorias en ausencia de TNF α , TNF α solo (10 ng/ml) o CD40-L (1 mg/ml) (Prospec-Tany TechnoGene Ltd, East Brunswick, NJ, EEUU). Adicionalmente, en los experimentos en los que se especifica, alguno de los agonistas TLR que se enumeran a continuación fue empleado para la maduración de las iDCs: LPS (100 y 500 ng/ml), FSL1 (100 ng/ml), Imiquimod (1 μ g/ml), ssRNA40 (1 μ g/ml), Pam3CysSerLys4 (1 μ g/ml), ST Flagellin (200 ng/ml) y Poly(I:C) (12,5 μ g/ml) (todos ellos de Invivogen, San Diego, CA, EEUU).

Según se indica en cada caso, iDCs y mDCs fueron cultivadas con BMP-4 (50 ng/ml) a lo largo de diferentes periodos de tiempo para el posterior análisis de algunas de las características de estas células. En el caso de las iDCs, el inhibidor de la vía canónica de señalización BMP, dorsomorfina (DM) (Calbiochem, Nottingham, RU), fue adicionado a estos cultivos a una concentración de 10 μ M como forma de bloquear el efecto del tratamiento con BMP-4. En algunos experimentos las mDCs fueron cultivadas durante 36 horas adicionales, sin ser levantadas, tras la adición únicamente de DM (20 μ M). Para inhibir la vía canónica de señalización BMP durante el proceso de maduración de las DCs, el inhibidor DM fue añadido 1 hora previa a la estimulación con el cóctel de citoquinas pro-inflamatorias y mantenido a lo largo de todo el proceso a una concentración final de 10 y 20 μ M.

En otro conjunto de experimentos, las iDCs fueron maduras o bien con el cóctel de citoquinas pro-inflamatorias o con los agonistas de TLR LPS y Poly I:C, todos ellos en presencia, y previo tratamiento de una hora, de los siguientes compuesto inhibidores: SB203580, inhibidor de la p38 MAPK (10 μ M); PD98059, inhibidor de la vía Erk/MEK (10 μ M); wortmanina, inhibidor de la proteína PI3K (1 μ M); SKI1, inhibidor de proteína quinasa src (5 μ M); INK-6, inhibidor del factor de transcripción NFAT (2,5 μ M); CK59, inhibidor de la proteína CaMKII (10 μ M); JNK II inhibitor, inhibidor de la proteína JNK2 (10 μ M); CG06983, inhibidor de la PKC (5 μ M); JSH23,

inhibidor del factor de transcripción NF-KB (10 μ M) (todos ellos de Tocris Bioscience, R&D Systems, Minneapolis, MN, EEUU)

3. Cultivo de cDCs

A partir de células mononucleares de sangre periférica, las cDCs fueron aisladas por métodos inmunomagnéticos en base a la expresión de la molécula BDCA-1, y seguidamente a la depleción de células CD19⁺, usando el CD1c (BDCA-1)⁺ Dendritic Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec), según las instrucciones del fabricante. Las cDCs purificadas fueron cultivadas en placas de 96 pocillos de fondo plano, a una concentración de 10⁶ cél/ml, en medio AIM-V libre de suero suplementado con 2 mM de L-glutamina. Los cultivos de las cDCs fueron llevados a cabo durante 36 horas en medio solo o con el mismo cóctel de citoquinas pro-inflamatorias usado con las MoDCs. En los casos en donde se indica, el inhibidor DM fue añadido a diferentes concentraciones de forma simultánea al cóctel de estimulación. Alternativamente, las cDCs fueron cultivadas en medio solo o suplementado con BMP-4 (50 ng/ml) durante 60-84 horas para su posterior análisis en un citómetro de flujo.

4. Cultivo de linfocitos T CD4⁺ vírgenes

A partir de células mononucleares de sangre periférica se aislaron linfocitos T CD4⁺CD45RA⁺ mediante depleción magnética usando el kit Naive CD4⁺ T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec), según las instrucciones del fabricante. 2-3·10⁵ células purificadas fueron cultivadas en placas de 96 pocillos de fondo plano en un volumen final de 200 μ l de medio completo, compuesto por RPMI 1640 (Sigma España) suplementado con suero fetal bovino al 10% (Invitrogen, Life Technologies), 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato sódico, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina (todos los componentes de Sigma-España). Para la activación estándar de las células T, anticuerpos monoclonales anti-CD3 diluidos en PBS (10 μ g/ml) (NA/LE, BD Biosciences, San Diego, CA, EEUU) fueron previamente unidos a la superficie de los pocillos mediante 90 minutos de incubación a 37°C. El anticuerpo sobrante fue retirado de los pocillos tras repetidos lavados con PBS a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron a las células en suspensión anticuerpos monoclonales anti-CD28 (4 μ g/ml) (NA/LE, BD Biosciences) y las células fueron

cultivadas durante diferentes periodos de tiempo de hasta 6 días a 37°C, en atmósfera húmeda y al 5% de CO₂.

En los casos indicados, la vía de señalización BMP fue estimulada durante la activación de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes mediante la adición de BMP-2 (100 ng/ml) o BMP-4 (50 ng/ml) (ambas proteínas de Humanzyme) a las células en suspensión.

De forma alternativa, las células mononucleares de sangre periférica fueron cultivadas en placas de 96 pocillos de fondo plano, a una concentración de 10⁶ cél/ml, en presencia de ConA (5 mg/ml) o PMA (0,1 mg/ml) más Ionomicina (20 ng/ml) (todos de Sigma-España). A las 36 horas de activación, las células fueron recogidas y analizadas para la expresión de diferentes moléculas de membrana mediante citometría de flujo.

5. Determinación de la respuesta proliferativa de los linfocitos T

La tasa de proliferación de los linfocitos T fue determinada en los tiempos indicados mediante el kit específico 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III (Roche Diagnostics, Madrid, España), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante para células en suspensión. Brevemente, se adicionó al medio de cultivo 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) a una concentración final de 10 µM durante las 12 horas finales del cultivo. Después de centrifugar las placas, se recogió el sobrenadante y las células fueron secadas durante 2 horas a 65°C, fijadas con etanol en HCl (0,5 M) durante 30 minutos a -20°C, tratadas con nucleasas 30 minutos a 37°C y finalmente incubadas 30 minutos a 37°C con un anticuerpo anti-BrdU de ratón conjugado a peroxidasa. El revelado del ensayo fue desarrollado con el sustrato ABTS (ácido 2, 2' Azinobis-[3-etil- benzotiazolin-6] sulfónico) y la absorbancia fue medida usando un lector de ELISA (SUNRISE, Tecan Group Ltd., Männedorf, Suiza) a 405 nm con una longitud de onda de referencia a 492 nm.

Alternativamente, los linfocitos T CD4⁺ vírgenes fueron teñidos con CFSE (Sigma-España) previamente a su cultivo siguiendo el protocolo que a continuación se describe: las células T purificadas fueron incubadas durante 5 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad con CFSE a una concentración final de 5 µM, y seguidamente fueron lavadas repetidas veces para la eliminación del CFSE sobrante. El porcentaje de células que se habían dividido fue determinado en un citómetro de flujo en base a la pérdida de intensidad de CFSE. La disminución a la mitad de la intensidad media de

fluorescencia respecto a la población con mayor cantidad de CFSE fue considerada como un ciclo de división celular y el número de divisiones experimentadas por una célula fue calculado en base a este principio.

La determinación por citometría de flujo de la proporción de células que se encuentran en cada fase del ciclo celular se llevó a cabo por el método de tinción de ADN empleando el colorante fluorescente Hoechst 33342 (Invitrogen, Life Technologies). Las células fueron fijadas con BD cellFIX™ (BD Biosciences) durante al menos 30 minutos a 2-4 °C y permeabilizadas en PBS 1% BSA 30% etanol en presencia del colorante Hoechst a una concentración final de 0,1 mg/ml. Tras unos 45 minutos de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, las células fueron analizadas en un citómetro de flujo LSR-II (BD Biosciences). Los agregados de células fueron excluidos en base al ancho y el área de la señal emitida por Hoechst y el porcentaje de células en las fases G₀/G₁ y S/G₂/M fue determinado. El análisis de los resultados se llevó a cabo en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) del Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la Universidad Complutense de Madrid.

6. Funcionalidad de la vía de señalización BMP y regulación de genes diana

Tanto las células T como las DCs fueron estimuladas durante una 1 hora con BMP-4 (50 ng/ml) solo o junto con el compuesto inhibidor DM (2 µM) o el compuesto inhibidor SB203580 (10 µM) adicionados 1 hora previa al tratamiento con BMP-4. Una vez transcurrido el tiempo correspondiente, las células fueron recolectadas y procesadas para la extracción del ARN y posterior estudio de la expresión de los genes que se indican en cada caso mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Células sin tratar fueron usadas para la determinación de los niveles basales de expresión de los genes a estudiar.

7. Análisis por RT-PCR punto final

El aislamiento y purificación de ARN se llevó a cabo usando el kit Absolutely RNA Microprep (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, EEUU), e incluyendo un paso de digestión con ADNasa I, a recomendación de los proveedores, para eliminar la contaminación por ADN genómico. El ADN complementario total (ADNc) fue

sintetizado con el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ADNc obtenidos fueron empleados como molde para el análisis por PCR punto final usando la Taq ADN polimerasa AmpliTaqGold (Applied Biosystems) y añadiendo en cada caso los cebadores específicos para cada gen (Tabla 1). En todos los casos, las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Px2 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU). Los productos de la PCR fueron resueltos en geles de agarosa al 2 % y los tamaños determinados fueron los esperados.

Gen	Forward (3'-5')	Reverse (5'-3')	T ^a (°C)	Prod. (bp)
β-actina	AGAGATGGCCACGGCTGCTT	ATTTGCGGTGGACGATGGAG	58	298
BMP4	AAAGGGGCTTCCACCGTAT	CCGCTGTGAGTGCTTAG	58	386
BMPRIA	CATTCGATGGCTGGTTTGT	TCCATATCGGCCTTTACCAA	58	298
BMPRIB	CATGCTTTTGCGAAGTGCAG	CAGGCAACCCAGAGTCATCC	60	197
ActRIA	GGTTCCCAATGACCCAAGTTT	CGAGCGAGGTTAGGGTGGTT	60	416
BMPRII	AAGCGAGGTTGGCACTATCA	TTTGGCACACGCCTATTATGT	56	495
SMAD1	GCAAAGTCGGAAGTCAACTA	GAGGTGAACCCATTTGAGTAAGA	60	308
SMAD4	CAGCACCACCCGCCTATG	CCAAACATCACCTTCACCTTTACAT	60	330
SMAD5	TCCAGCAGTAAAGCGATTGT	TGGAAACGTGGCATTTTG	58	487
SMAD8	ACGTCGGGGGAGAGGTGTAT	GGTGACATCCTGGCGATGA	60	277

Tabla 1. Secuencias cebadoras empleadas para los ensayos de RT-PCR

8. Análisis por PCR cuantitativa en tiempo real

Adicionalmente, los ADNc obtenidos por RT-PCR fueron empleados para el estudio por PCR cuantitativa en tiempo real de diversos genes usando los siguientes ensayos TaqMan: *BMPRIA* (Hs01034909_g1), *BMPRIB* (Hs00176144_m1), *ACVRIA* (Hs00153836_m1), *BAMBI* (Hs00180818_m1), *BMP2* (Hs00154192_m1), *BMP6* (Hs01099594_m1), *BMP7* (Hs00233476_m1), *SMAD1* (Hs00195432_m1), *SMAD4* (Hs00929647_m1), *SMAD5* (Hs00195437_m1), *SMAD8* (Hs00195441_m1), *ID1A* (Hs00357821_g1), *ID1B* (Hs00704053_s1), *ID2* (Hs00747379_m1), *ID3* (Hs00171409_m1), *RUNX1* (Hs01021971_m1), *RUNX2* (Hs01047976_m1), *RUNX3* (Hs00231709_m1), *IRF1* (Hs00971965_m1) e *IRF8* (Hs00175238_m1), todos obtenidos de Applied Biosystems. Como control endógeno se usaron el gen de la

GAPDH y el de la *GNB2L1*, ambos pre-desarrollados por Applied Biosystems. Todas las PCRs fueron realizadas por duplicado usando el TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) conforme a las instrucciones del fabricante. Las amplificaciones, detecciones y análisis fueron realizados en un 7.900HT Fast Real-time PCR System (Centro de Genómica, Universidad Complutense de Madrid). Para la normalización con la *GAPDH* o la *GNB2L1* se empleó el método del ΔCt .

9. Citometría de flujo

Los anticuerpos empleados para los estudios fenotípicos están recogidos en la Tabla 2. Para las tinciones inmunofluorescentes simples, dobles, triples y cuádruples se procedió incubando las células en PBS en presencia de cantidades saturantes de los anticuerpos indicados en cada caso durante 30 minutos a 4 °C. Para las tinciones intracelulares, y de acuerdo con las instrucciones del fabricante, las células fueron tratadas con la solución Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) durante 20 minutos a 4 °C, lavadas posteriormente con la solución Perm/Wash (BD Biosciences), y marcadas con los anticuerpos contra Bcl-2, Bcl-X_L y Bax seguido de fragmentos F(ab')₂ de IgG de burro anti-ratón o anti-conejo multiabsorbidos y conjugados a fluorocromo (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, EEUU), todos diluidos en solución Perm/Wash.

Para la detección de Smad-1/5/8 fosforilada, primeramente, las células fueron fijadas con BD cellFIX (BD Biosciences) durante 30 minutos a 4 °C para impedir cambios en el estado de fosforilación de las proteínas. Tras un lavado con PBS, las células se permeabilizaron incubando 30 minutos a 4 °C con la solución BD Phosflow Perm Buffer III y fueron marcadas con anticuerpos contra fosfo-Smad-1/5/8 (Ser463/Ser465), seguido de fragmentos F(ab')₂ de IgG de burro anti-conejo multiabsorbidos y conjugados a fluorocromo (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Como control negativo, las células fueron incubadas con anticuerpos pre-absorbidos con el péptido bloqueante (Santa Cruz Biotechnology), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para la tinción intracelular de la proteína IRF1, las células fueron fijadas y permeabilizadas con la solución Fixation/Permeabilization (eBiosciences, San Diego, CA, EEUU), lavadas con Permeabilization Buffer (eBiosciences) y marcadas específicamente con el anticuerpo policlonal anti-IRF1 (Santa Cruz Biotechnology) de

conejo, seguido de fragmentos F(ab')₂ de IgG de burro anti-conejo multiabsorbidos y conjugados a fluorocromo (Jackson Immunoresearch Laboratories), todos diluidos en la solución Permeabilization Buffer.

En todos los casos el análisis de los resultados se llevó a cabo en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences) del Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la Universidad Complutense de Madrid.

Molécula diana	Clon	Casa comercial	Fluorocromo
ActRIA/ALK-2	policlonal	R&D Systems	Purificado
BAMBI	4E8	eBioscience	PE
Bax	policlonal	BD Biosciences	Purificado
Bcl-x _L	BXL03	Chemicon International	Purificado
Bcl-2	Bcl-2/100	BD Biosciences	PE
BMPRIA/ALK-3	policlonal	R&D Systems	Purificado
BMPRIB/ALK-6	policlonal	Santa Cruz Biotechnology	PE
BMPRII	policlonal	Santa Cruz Biotechnology	Purificado
CD3	HIT	BD Biosciences	PE
CD4	HP2/6	ImmunoStep	PerCP
CD25	BC96	BioLegend	APC
CD40	5C3	BD Biosciences	FITC
CD69	FN50	BioLegend	PE
CD80	BB1	BD Biosciences	FITC
CD86	IT2.2	BioLegend	PE-Cy5
CD83	HB15e	BioLegend	PE-Cy5
HLA-DR	G46-6	BD Biosciences	APC
IRF1 (C-20)	policlonal	Santa Cruz Biotechnology	Purificado
MMR	15-2	BioLegend	FITC
p-Smad-1/5/8	policlonal	Santa Cruz Biotechnology	Purificado
PD-L1	29E.2A3	BioLegend	APC
PD-L2	24F.10C12	BioLegend	PE

Tabla 2: Anticuerpos utilizados para citometría de flujo.

10. Ensayo de apoptosis

iDCs y mDCs fueron cultivadas en AIM-V solo o suplementado con BMP-4 a diferentes concentraciones. Tras 36 horas, la proporción de células apoptóticas fue determinada mediante tinción con Anexina-V-FLUOS (Roche Diagnostics), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los análisis se llevaron a cabo en un citómetro de flujo FACSCalibur, excluyendo las células necróticas en función de su tamaño y complejidad y de la captación de yoduro de propidio. Las células apoptóticas fueron definidas como Anexina-V positivas dentro de la población negativa para yoduro de propidio.

El mismo método de tinción con Anexina-V-FLUOS fue empleado para la determinación del porcentaje de células apoptóticas en MoDCs y cDCs maduras en ausencia o presencia de DM y en iDCs transfectadas y maduras.

11. Ensayo de internalización

En iDCs cultivadas durante 36 horas en ausencia o presencia de BMP-4 (50 ngr/ml) se midió la endocitosis de fase fluida, tanto la inespecífica como la mediada por receptor tras la incubación durante 1 hora a 37° C con 1mg/ml de Amarillo Lucifer o 100 µg/ml de FITC-dextrano 40-kDa (ambos de Sigma-Aldrich), respectivamente. Las células control fueron tratadas de forma similar a una temperatura de 2-4° C. Una vez eliminado el material exógeno sobrante por medio de repetidos lavados, se llevó a cabo el análisis de los resultados en un citómetro de flujo FACSCalibur.

12. Determinación de factores solubles en sobrenadantes

Los sobrenadantes de los cultivos celulares fueron recogidos y ensayados para las concentraciones de diferentes factores solubles o congelados a -80°C para su posterior análisis. Los niveles de IL-4, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF α , IFN γ (todos de BioLegend) e IL-2 (Bender MedSystems, Viena, Austria) fueron determinados mediante ELISA. En los casos en que se indica, las concentraciones de IL-1 β , IL-6, IL-10 e IL-12p70 se cuantificaron usando el sistema Cytometric Bead Array Flex Set (BD Biosciences), siguiendo las instrucciones del distribuidor, y llevando a cabo el análisis de las muestras en un citómetro FACSCalibur.

La secreción al medio de BMP-4 se determinó en los sobrenadantes de células en cultivo, usando en todos los casos el kit human BMP-4 DuoSet ELISA (R&D Systems).

13. Reacción mixta de linfocitos (MLR)

iDCs y mDCs fueron usadas como estimuladoras de células T CD4⁺ vírgenes alogénicas aisladas de sangre periférica por depleción magnética, como se ha descrito anteriormente. Los co-cultivos fueron llevados a cabo a diferentes ratios DC/célula T ($2 \cdot 10^5$ células T/pocillo), en placas de 96 pocillos de fondo plano y en un volumen final de 200 μ l de medio completo. La respuesta proliferativa de los linfocitos T fue determinada a los 6 días de cultivo mediante el kit específico BrdU Labeling and Detection Kit III, tal y como se ha descrito anteriormente.

En los casos indicados, el inhibidor de la vía canónica de señalización BMP DMH1 (Tocris Bioscience) fue añadido desde el día 0 a los co-cultivos linfocito T CD4⁺ virgen-mDC a las concentraciones finales de 20 y 40 μ M.

14. Activación de células NK mediante co-cultivo con DCs autólogas

Para el estudio de la activación de las células NK por contacto con DCs, iDCs y mDCs fueron usadas como estimuladoras de células NK autólogas en reposo aisladas de sangre periférica mediante depleción inmunomagnética. Los co-cultivos fueron llevados a cabo a un ratio DC/NK 1:5 ($2 \cdot 10^5$ células NK/pocillo), en placas de 96 pocillos de fondo plano y en un volumen final de 200 μ l de medio completo. Tras 12 horas de co-cultivo, las células NK fueron recogidas y usadas como efectoras contra la línea tumoral K562 en co-cultivos realizados en placas de 96 pocillos de fondo plano y a los diferentes ratios Efector:Diana que son indicados (10^4 células K562/pocillo). La actividad citolítica de las células NK sobre las células K562 fue determinada tras 4 horas de co-cultivo a partir de la actividad lactato deshidrogenasa detectada en el sobrenadante de los cultivos mediante métodos colorimétricos usando el kit Cytotoxicity Detection Kit LDH (Roche), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Células K562 fueron cultivadas solas y tratadas o no a las 4 horas con solución de lisis para los niveles máximos y mínimos, respectivamente, de actividad lactato

deshidrogena. El porcentaje de lisis específica fue calculado mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Citotoxicidad específica (\%)} = \frac{\text{Valor experimental} - \text{valor mínimo}}{\text{Valor máximo} - \text{valor mínimo}} \times 100$$

15. Silenciamiento de IRF1 en iDCs

Para llevar a cabo el silenciamiento de IRF1 durante la maduración de las iDCs se emplearon ARNs pequeños de interferencia (siRNAs) (*Silencer*® Select Pre-Designed & Validated siRNA de Ambion, Life Technologies). Como método de transfección se utilizó la técnica de Nucleofección® para la creación de pequeños poros en la membrana citoplásmica y nuclear mediante pulso eléctrico, empleando el kit P3 Primary Cell 4D-Nucleofector® X Kit y el Amaxa 4D-Nucleofector™ (ambos de Lonza Hopkinton, MA, EEUU). Para el silenciamiento de IRF1 se ensayaron 2 siRNAs diferentes (siRNA IDs: ID: s7501 y s7503), siempre a una concentración final de 250 nM, de los cuales el s7503 fue el que mostró mayor eficacia en el silenciamiento de IRF1 y cuyos efectos son, por lo tanto, los únicos mostrados en el apartado de resultados correspondiente a este estudio. Como control negativo se empleó un siRNA no específico con el objetivo de discernir el efecto específico del silenciamiento del gen diana de los posibles efectos derivados de la introducción de un siRNA dentro de las células. Concretamente, se empleó el *Silencer*® Select Negative Control siRNA#1 (Life Technologies) a la misma concentración que los siRNAs específicos.

Las iDCs empleadas en los experimentos de silenciamiento fueron generadas en medio completo para incrementar el rendimiento del proceso de diferenciación y mejorar la viabilidad de las células que iban a ser sometidas a la nucleofección. Tras su diferenciación, las iDCs fueron lavadas varias veces previamente a la transfección y cada grupo experimental ($3\text{-}4 \cdot 10^6$ células/grupo) fue resuspendido en 100 µl de solución de nucleofección más el siRNA correspondiente. Las iDCs transfectadas fueron cultivadas en medio completo durante 3 horas a una concentración de $1,5\text{-}2 \cdot 10^6$ células/ml y a continuación el medio de cultivo fue suplementado con el mismo cóctel de citoquinas pro-inflamatorias usado para la maduración estándar de las DCs, que incluye IL-1β, IL-6, TNFα y de PGE2. Tras 36 horas de estimulación, las mDCs

resultantes fueron empleadas para el estudio de su viabilidad y la expresión de marcadores de maduración mediante citometría de flujo y para la determinación de la expresión de *IRF1* mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real.

16. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos se aplicó una “t” de Student, o el test Mann-Whitney-Wilcoxon dónde se indica, con los siguientes niveles de significación: $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$ y $***p \leq 0,001$.

RESULTADOS

1. EXPRESIÓN Y FUNCIONALIDAD DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN BMP EN LAS MoDCs

1.1 Las MoDCs expresan los componentes principales de la vía canónica de señalización BMP

Como primera aproximación, se determinó mediante RT-PCR si las MoDCs expresaban los componentes principales de la vía canónica de señalización BMP. Como muestra la Figura 1A, tanto las iDCs como las mDCs resultaron positivas para la presencia de los transcritos que codifican para los receptores específicos de BMP (BMPRIA/ALK-3, BMPRIB/ALK-6, ActRIA/ALK-2 y BMPRII), así como para las proteínas BR-Smad (Smad-1, -5 y -8) y la Smad correceptora o Co-Smad (Smad-4). Adicionalmente, la expresión de los receptores tipo I se cuantificó mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real, observándose tanto en el estadio inmaduro como en el maduro una elevada tasa de transcripción de los receptores *BMPRIA/ALK-3* y *ActRIA/ALK-2* en comparación con la del receptor *BMPRIB/ALK-6* (Figura 1B).

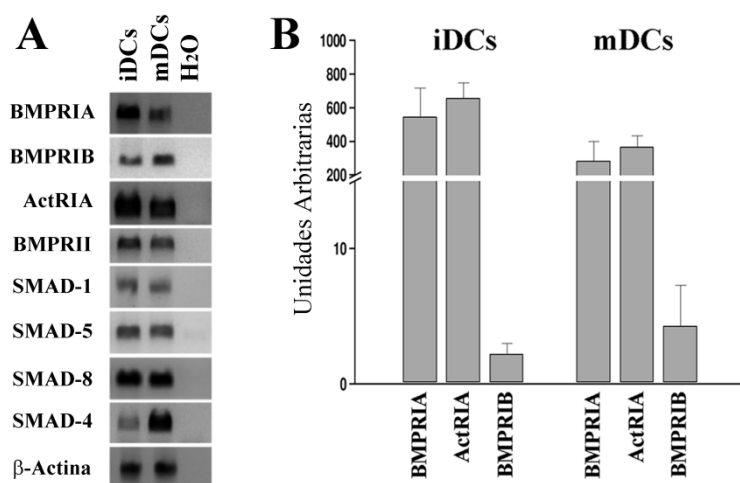


Figura 1. Expresión de los componentes de la vía de señalización BMP en MoDCs inmaduras y maduras. iDCs fueron generadas a partir de monocitos de sangre periférica y su maduración (mDCs) fue inducida tras 36 horas de estimulación con un cóctel de citoquinas pro-inflamatorias. (A) Análisis por RT-PCR punto final de la expresión de diferentes componentes de la vía de señalización BMP en iDCs y mDCs. Se muestra un experimento representativo de al menos 3 independientes. Se

empleó agua como control negativo en la RT-PCR. (B) Análisis por RT-PCR cuantitativa a tiempo real de la expresión de los receptores de BMP tipo I en iDCs y mDCs. Los datos mostrados se refieren a la expresión normalizada frente a la de GAPDH. Las barras representan la media ± desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes.

A continuación, se analizó por citometría de flujo la expresión de los receptores de BMP (Figura 2). Como muestran las gráficas de dispersión, tanto en la subpoblación de iDCs como en la de mDCs se confirmó la expresión en membrana de los receptores de BMP tipo I y del pseudorreceptor BAMBI. Mientras que la expresión del receptor

BMPRIIB no mostró diferencias entre iDCs y mDCs, sí se observó una menor expresión de BMPRIA y del pseudorreceptor BAMBI tras la maduración de las DCs. Por el contrario, la expresión de ActRIA y BMPRII en la superficie celular se vio incrementada en las mDCs. Por lo tanto, estos resultados indican un cambio en el perfil de expresión en membrana de los receptores de BMP durante el proceso de maduración inducido por citoquinas pro-inflamatorias, lo que a su vez podría sugerir un cambio en el patrón de acción de los ligandos BMP antes y después de la maduración.

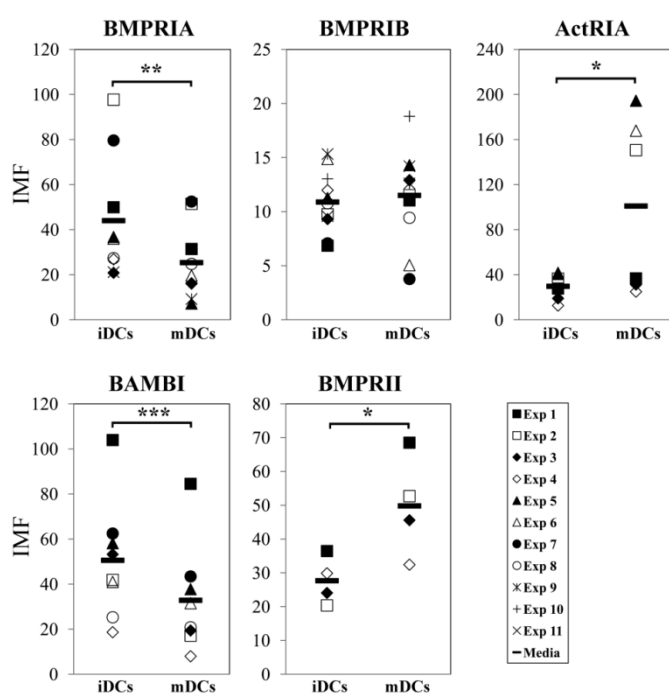


Figura 2. Expresión en membrana de los receptores de BMP en DCs. iDCs y mDCs fueron analizadas mediante citometría de flujo para la expresión de los receptores de BMP tipo I y tipo II y del pseudorreceptor BAMBI. Las gráficas de dispersión muestran el valor de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de 4-11 experimentos independientes y el valor medio en cada caso (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$; mediante prueba t).

1.2 La vía de señalización BMP es funcional en las MoDCs

Una vez confirmada la presencia en las MoDCs de toda la maquinaria molecular necesaria para la señalización BMP, se llevó a cabo el estudio de la funcionalidad de esta vía de señalización. Primeramente, se analizó la capacidad de las DCs para responder a la estimulación con ligandos BMP, concretamente BMP-4, mediante la valoración de los niveles de fosforilación de las proteínas BR-Smad, principales mediadoras de la señalización BMP. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con BMP-4 a lo largo de una hora produjo un incremento en los niveles de Smad-1/5/8 fosforiladas de forma muy similar en iDCs y mDCs (Figura 3), aumentándose entre 3 y 4 veces el porcentaje de células positivas para Smad-1/5/8

fosforiladas en ambas subpoblaciones de DCs. Cabe destacar también que el perfil de las BR-Smads fosforiladas en mDCs se encontraba desplazado hacia la derecha respecto al de las iDCs, lo cual podría tener implicaciones que serán analizadas más adelante.

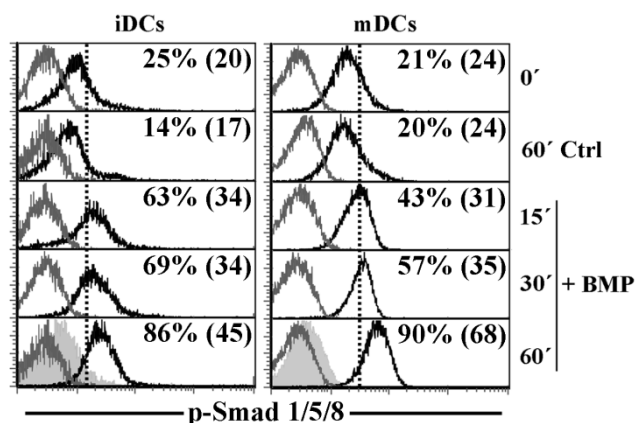


Figura 3. Activación de la vía canónica de señalización BMP en respuesta a BMP-4. iDCs y mDCs fueron cultivadas durante 1 h en ausencia o presencia de BMP-4 (50 ng/ml) y los niveles de Smad-1/5/8 fosforilada fueron determinados por citometría de flujo en los tiempos indicados. El porcentaje de células positivas y la intensidad media de fluorescencia son indicados en cada histograma. Los perfiles grises muestran

los niveles basales de fluorescencia (células no teñidas). Como control negativo, la tinción fue realizada con los anticuerpos pre-adsorbidos con el péptido bloqueante (histogramas rellenos). Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes.

Las proteínas ID han sido clásicamente descritas como genes diana de la vía de señalización BMP, por lo que también se estudió la capacidad de las DCs para modular la expresión de los genes *ID* en respuesta a los ligandos BMP. Tanto las iDCs como las mDCs incrementaron la tasa de transcripción de *ID1*, *ID2* e *ID3* tras 1 hora de estimulación, siendo *ID3* el gen más sensible a dicha estimulación en ambos casos (Figura 4). El tratamiento previo con el inhibidor DM, que inhibe la ruta canónica de señalización BMP, bloqueó por completo la inducción de los tres genes *ID* en iDCs, mientras que solo de los genes *ID1* e *ID3* en mDCs. Cuando se empleó SB203580 como inhibidor que impide la fosforilación de p38 bloqueando, por tanto, una de las principales vías no canónicas de señalización BMP, se consiguió anular la inducción de *ID2* en mDCs sin afectar al resto de genes *ID*. Como era esperable, SB203580 no tuvo efecto sobre la transcripción de *ID1* e *ID3* inducida en mDCs ni sobre ninguno de los genes *ID* estudiados en iDCs.

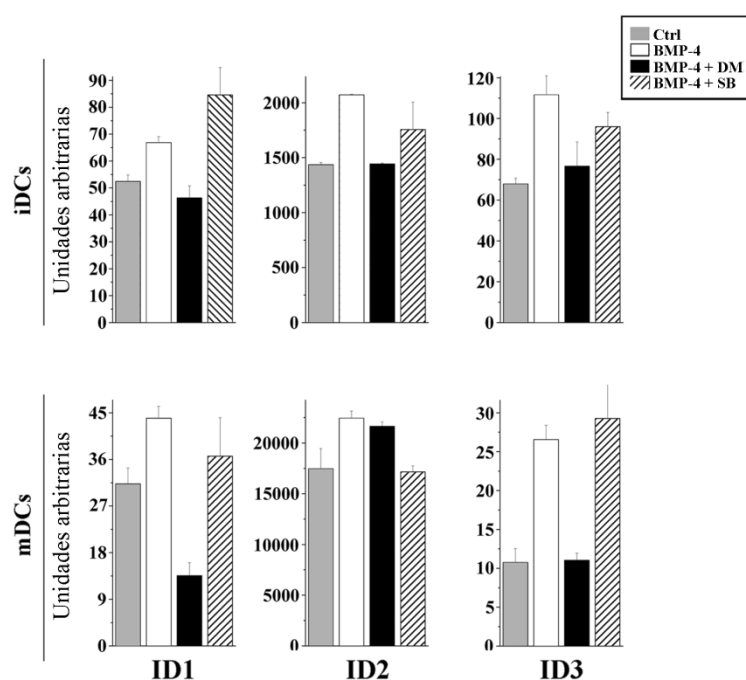


Figura 4. Inducción de los genes ID en respuesta a BMP-4. iDCs y mDCs fueron cultivadas durante 1 h en presencia de BMP-4 50 ng/ml solo (barras blancas) o junto con DM 2 μ M (DM, barras negras) o SB203580 10 μ M (SB, barras ralladas), ambos inhibidores añadidos 1 hora previamente a la estimulación con BMP-4. La modulación inducida por BMP-4 en los niveles de ARNm de ID1, ID2 e ID3 fue analizada mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real. DCs no tratadas fueron empleadas para determinar los niveles basales de transcrito para los genes ID (barras grises). Los datos mostrados se refieren a la expresión normalizada frente a la de

GAPDH. Se muestran las medias \pm desviación estándar de los duplicados de un experimento representativo de 2 independientes.

2. LA ESTIMULACIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN BMP NO AFECTA A LA DIFERENCIACIÓN DE LAS MoDCs

El hallazgo de que la vía de señalización BMP estaba presente y era funcional tanto en las iDCs como en las mDCs nos hizo plantearnos si las proteínas BMP podrían desempeñar algún papel en el proceso de diferenciación de las MoDCs. Como primera aproximación para responder esta pregunta se determinó si los monocitos de sangre periférica podrían estar capacitados para responder a los ligandos BMP. Mediante RT-PCR se pudo comprobar que los monocitos expresaban los transcritos correspondientes a los tres receptores de BMP tipo I y al receptor de BMP tipo II (Figura 5A). Asimismo, los monocitos resultaron positivos para la expresión de todas las BR-Smads, salvo Smad-8, y de la Co-Smad. Seguidamente, se analizó por citometría de flujo la expresión en membrana de los tres receptores de BMP tipo I, observándose una presencia mayoritaria de las tres proteínas en todos los individuos estudiados (Figura 5B) de forma que, a priori, los monocitos de sangre periférica podrían estar capacitados para responder a la estimulación con proteínas BMPs.

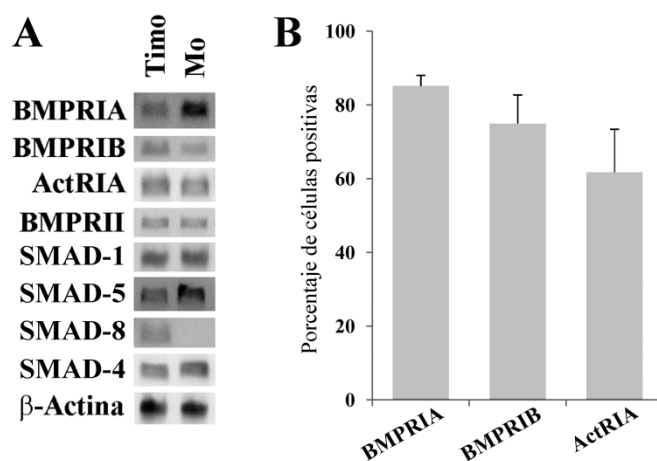


Figura 5. Expresión de diferentes componentes de la vía de señalización BMP en Monocitos. (A) Monocitos de sangre periférica (Mo) fueron aislados y la presencia del ARNm para diferentes componentes de la vía de señalización BMP fue determinada mediante RT-PCR. Células totales de timo fueron usadas como control positivo. (B) Estudio de la expresión en membrana de los receptores de BMP tipo I. A partir de las células mononucleares de sangre periférica, los monocitos fueron definidos en función de su tamaño/complejidad y la expresión de BMPRIA, BMPRIB y

ActRIA fue analizada por citometría de flujo. Los resultados muestran la media \pm desviación estándar del porcentaje de células positivas de 7 donantes diferentes.

Para estudiar el posible papel de la señalización BMP en el proceso de diferenciación de DCs a partir de monocitos de sangre periférica, se añadió BMP-4 al cóctel de diferenciación y el fenotipo de las iDCs resultantes fue comparado al de las células diferenciadas en condiciones control. Dos de las particularidades que caracterizan a las MoDCs, expresión de CD1a y pérdida de CD14, no fueron alteradas por ninguna de las dosis ensayadas de BMP-4 (Figura 6A). Igualmente, la expresión de los marcadores de maduración CD80, CD86 y de la molécula del MHC de clase II, HLA-DR, no mostraron ninguna alteración a causa de la presencia de BMP-4 a lo largo del proceso de diferenciación de las MoDCs (Figura 6A). A continuación se estudió la capacidad de las iDCs generadas para estimular la proliferación de linfocitos T CD4⁺CD45RA⁺ alogénicos, encontrándose de nuevo que la adición de BMP-4 al medio de diferenciación no alteraba la capacidad aloestimuladora de estas células y corroborando, por tanto, las observaciones realizadas a nivel de fenotipo (Figura 6B).

Por último, se evaluó si la adición de ligandos BMP durante la diferenciación de las DCs podría tener alguna repercusión sobre su capacidad para aumentar la expresión de marcadores de maduración en respuesta a la estimulación con citoquinas pro-inflamatorias. Aunque el análisis por citometría de flujo tras la estimulación de las iDCs mostró una mayor expresión de CD86 en las células que habían sido diferenciadas en presencia de BMP-4 respecto a las células control, las modificaciones en la expresión del resto de marcadores estudiados no mostraron una tendencia clara en uno u otro sentido (Figura 6C). Se podría decir, por lo tanto, que la activación de la vía de

señalización BMP durante la diferenciación de las iDCs no alteró la capacidad de estas células para alcanzar un fenotipo maduro en respuesta a citoquinas pro-inflamatorias.

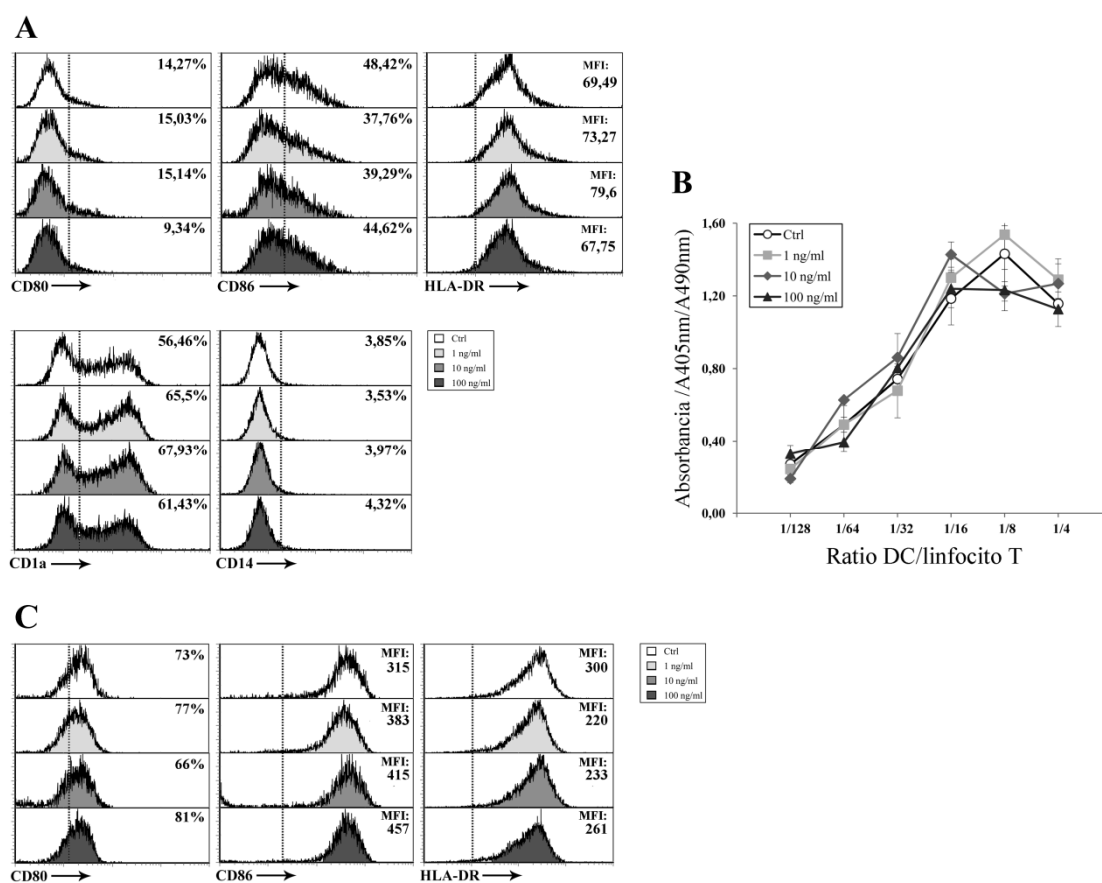


Figura 6. La activación de la vía de señalización BMP no afecta a la diferenciación y funcionalidad de las MoDCs. iDCs fueron diferenciadas a partir de monocitos de sangre periférica mediante el cultivo con GM-CSF e IL-4 en ausencia (Ctrl) o presencia de BMP-4 a las concentraciones indicadas. (A) Tras 6 días de diferenciación, la expresión de diferentes moléculas de superficie fueron analizadas por citometría de flujo. (B) Adicionalmente, iDCs diferenciadas en ausencia (Ctrl) o presencia de diferentes dosis de BMP-4 fueron cultivadas con linfocitos T CD4⁺ vírgenes alogénicos. Tras 5 días de co-cultivo, se añadió BrdU durante las siguientes 12 h y un kit específico fue empleado para medir la incorporación de BrdU al ADN de nueva síntesis. Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes. Se muestra la media \pm desviación estándar de los triplicados. (C) Las MoDCs generadas en ausencia o presencia de BMP-4 (1, 10 y 100 ng/ml) fueron estimuladas durante 36 horas con un cóctel de citoquinas pro-inflamatorias y la expresión de marcadores de maduración fue analizada por citometría de flujo. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. En todos los histogramas la línea discontinua indica los niveles basales de fluorescencia en células sin teñir.

3. EFECTOS DE LA ACTIVACIÓN EXÓGENA DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN BMP SOBRE LAS iDCs

3.1 BMP aumenta la supervivencia de las iDCs pero no de las mDCs

A tenor de los resultados anteriormente mostrados, la activación de la vía de señalización BMP no parece afectar al proceso de diferenciación de las MoDCs. Sin embargo, la capacidad de iDCs y mDCs para responder al ligando BMP-4 fosforilando a Smad-1/5/8 y modulando la expresión de los genes *ID*, nos hizo plantearnos si esta vía de señalización podría desempeñar alguna función en las DCs una vez diferenciadas. Puesto que las proteínas BMP actúan como factores de supervivencia para distintos tipos celulares, el primer acercamiento para dilucidar el papel de la vía de señalización BMP en las DCs fue estudiar si la estimulación de esta vía podría tener un efecto anti-apoptótico en estas células. Tras 36 horas de cultivo en ausencia de factores de crecimiento, la presencia de BMP-4 en el medio fue capaz de incrementar la supervivencia de las iDCs a cualquiera de las dosis ensayadas, reduciéndose más de la mitad el porcentaje de células apoptóticas cuando la dosis de 1 ng/ml fue ensayada (Figura 7A). Aunque en algunos experimentos también pudo observarse en las mDCs un efecto protector del tratamiento con BMP-4 sobre la muerte celular inducida por privación de factores de crecimiento, en ninguna de las dosis ensayadas este efecto de fue de la magnitud observada en las iDCs.

Para estudiar cual podría ser el mecanismo molecular por el cual la vía de señalización BMP aumenta la supervivencia de las iDCs, se determinaron los niveles de expresión de proteínas de la familia Bcl-2, que previamente han sido implicadas en el control de la supervivencia de las DCs¹⁷¹⁻¹⁷³. El análisis por citometría de flujo permitió observar que los niveles de Bcl-X_L, proteína anti-apoptótica, y Bax, pro-apoptótica, no se modificaban por el tratamiento con BMP-4 (Figura 7B). Por el contrario, sí se observó un importante incremento en la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, que, por tanto, podría ser el mecanismo responsable del aumento de la supervivencia inducido por la vía de señalización BMP en las iDCs.

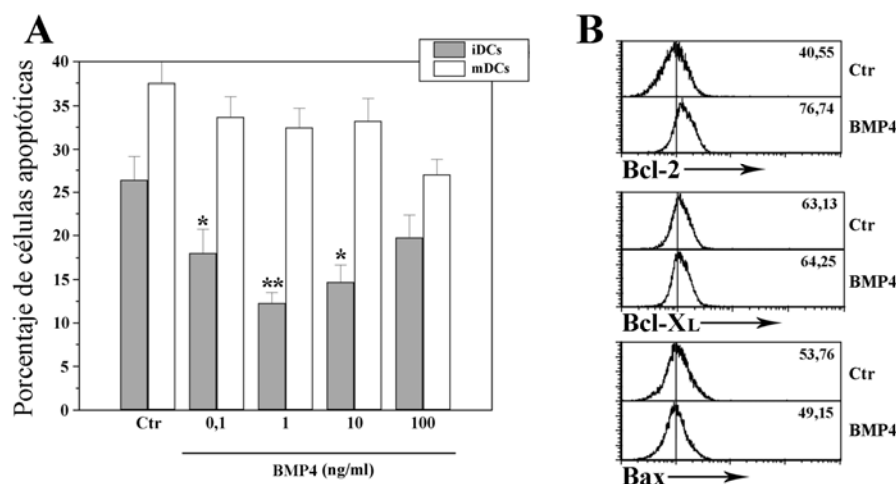


Figura 7. La estimulación de la vía de señalización BMP incrementa la supervivencia de las iDCs a través de un aumento en la expresión de Bcl-2. (A) Determinación de la viabilidad de iDCs (barras grises) y mDCs (barras blancas) tras 36 h de cultivo en medio libre de factores de crecimiento suplementado o no (Ctr) con diferentes dosis de BMP-4. El porcentaje de células apoptóticas fue determinado mediante tinción con Anexina V y ioduro de propidio. Las células apoptóticas fueron definidas como Anexina V positivas, ioduro de propidio negativas. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de 3 a 4 experimentos independientes (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; mediante prueba t). (B) La expresión de las proteínas Bcl-2, Bcl-XL y Bax fue determinada por citometría de flujo en iDCs no tratadas (Ctr) y tratadas (BMP4) con BMP-4. Las líneas discontinuas indican los niveles basales de fluorescencia en células teñidas únicamente con los anticuerpos secundarios. Los porcentajes de células positivas son indicados en cada histograma.

3.2 La activación de la vía de señalización BMP induce la maduración fenotípica de las MoDCs

A continuación se estudió el efecto de la activación de la vía de señalización BMP sobre el fenotipo de las iDCs evaluando el impacto del tratamiento con BMP-4 sobre la expresión de diferentes marcadores de maduración. La adición al medio de BMP-4 resultó en un aumento gradual, a lo largo de 60 horas, de la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 y CD86 (Figura 8A y B). Igualmente se incrementaron los niveles de expresión y el porcentaje de células que expresaban el marcador de maduración CD83 y los ligandos de PD-1, PD-L1 y PD-L2. Por último, el tratamiento con BMP-4 no modificó la expresión del receptor de manosa (MMR/CD206) (datos no mostrados).

Al comparar con otros estímulos de maduración se observó que las características fenotípicas alcanzadas por las DCs tratadas con BMP-4 eran muy similares a las de aquellas estimuladas con CD40-L, y comparables a los efectos de

otros estímulos de maduración típicos como LPS y $\text{TNF}\alpha$ (Figura 8). Asimismo, la adición simultánea del inhibidor DM junto con BMP-4 bloqueó de manera selectiva la inducción de los marcadores de maduración estudiados (Figura 8, paneles inferiores), demostrándose de este modo que el efecto observado tras la estimulación con BMP-4 se debía específicamente a la activación de la vía canónica de señalización BMP.

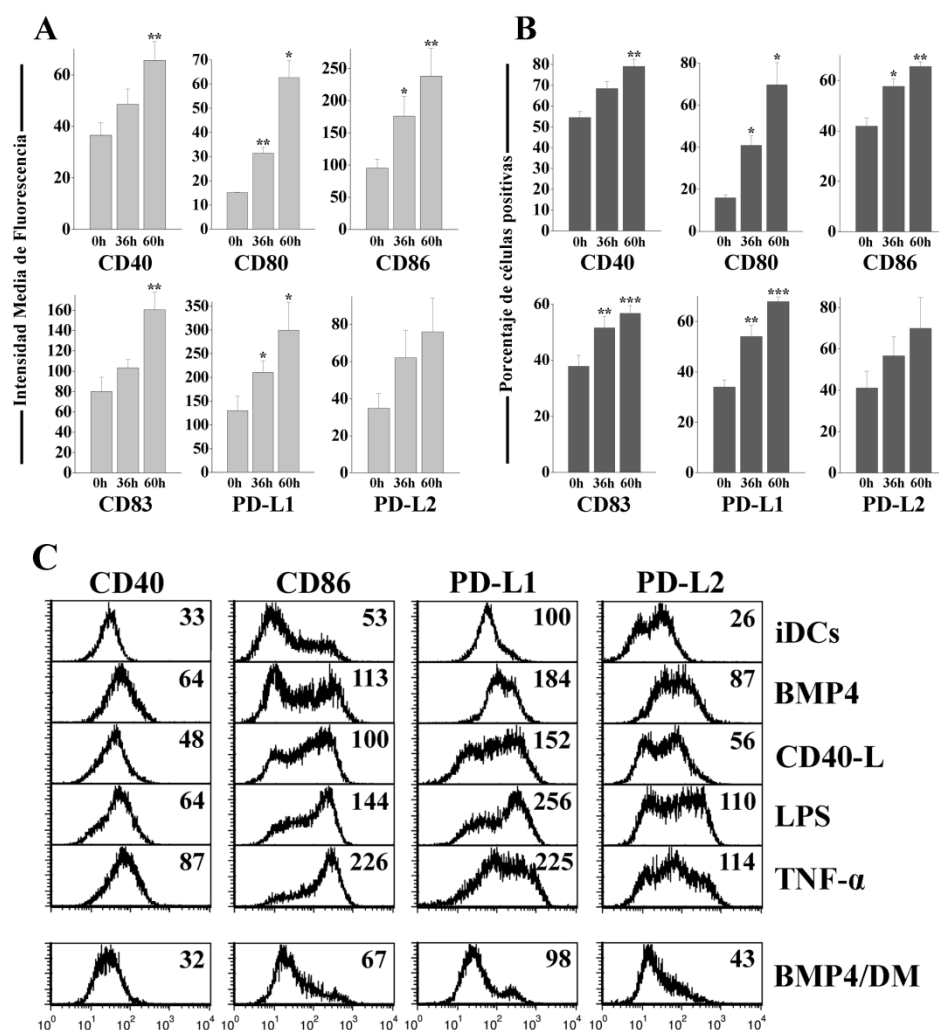


Figura 8. Análisis de la expresión de marcadores de maduración en iDCs en respuesta a la estimulación de la vía de señalización BMP. Tras 6 días de diferenciación, se añadió BMP-4 (50 ng/ml) a los cultivos de las iDCs y la expresión de marcadores de maduración fue analizada por citometría de flujo antes y después del tratamiento. Los resultados muestran la intensidad media de fluorescencia (A) y el porcentaje de células positivas (B) para cada marcador en los tiempos indicados a lo largo de 60 horas. Las barras representan la media \pm desviación estándar de 4-6 experimentos independientes (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,005$; mediante prueba t). (C) Las iDCs fueron tratadas o no durante 60 h con diferentes estímulos madurativos o BMP-4. Adicionalmente, iDCs fueron tratadas simultáneamente con BMP-4 más el inhibidor DM (BMP4/DM) también durante 60 horas. La intensidad media de fluorescencia es mostrada en cada histograma. Los resultados son representativos de al menos 3 experimentos independientes. El tratamiento con DM y BMP-4 no afectó significativamente a la viabilidad celular.

3.3 BMP no modifica la actividad endocítica de las MoDCs

Las iDCs presentan una alta capacidad endocítica que tras el estímulo madurativo sufre un incremento transitorio de unas horas para bloquearse en la condición madura. Puesto que nuestros resultados indicaban que la estimulación BMP suponía un estímulo madurativo para las DCs, estudiamos también su repercusión sobre la capacidad endocítica de estas células. Transcurridas 36 horas tras la adición de BMP-4, la ausencia de diferencias en la captación de dextrano entre las iDCs tratadas con BMP-4 y las iDCs control indicó que la endocitosis mediada por receptor no se veía alterada por el tratamiento. Estos resultados están en línea con la ausencia de efecto de la estimulación BMP sobre la expresión del receptor de manosa MMR/CD206. Adicionalmente, se observó en iDCs tratadas con BMP-4 un ligero aumento no significativo de la endocitosis no específica empleando la captación de amarillo Lucifer como un indicador de esta actividad endocítica (Figura 9).

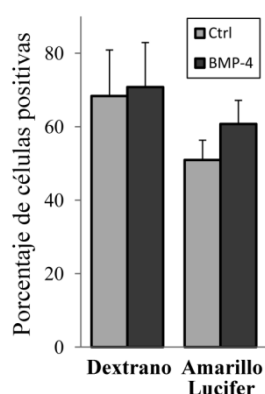


Figura 9. La estimulación de la vía de señalización BMP no modifica la capacidad endocítica de las iDCs. iDCs diferenciadas a partir de monocitos fueron cultivadas durante 36 h en presencia o ausencia de BMP-4 (50 ng/ml). Tras el tratamiento, la endocitosis de fase fluida inespecífica y mediada por receptor después de 1 hora de incubación con el compuesto Amarillo Lucifer (1mg/ml) o con Dextrano conjugado al fluorocromo FITC (100 µg/ml) respectivamente, fue determinada mediante citometría de flujo. La gráfica muestra la media \pm desviación estándar de los porcentajes de células positivas de 4 experimentos independientes.

3.4 La vía de señalización BMP regula la producción de citoquinas en las iDCs

La maduración de las DCs es un proceso asociado al incremento en la capacidad de producir un amplio espectro de citoquinas. Para estudiar el efecto de la señalización BMP sobre esta cualidad de las DCs, el sobrenadante de las iDCs cultivadas durante 36 horas en presencia de BMP-4 fue ensayado para la determinación de los niveles de $\text{TNF}\alpha$, IL-8, IL-10, IL-6, IL-1 β e IL-12p70. Los resultados obtenidos muestran que el tratamiento con BMP-4 incrementó de forma significativa la secreción de IL-8 por iDCs (Figura 10). Aunque de menor magnitud, también fue observado un aumento en la

producción de IL-10, IL-6 y TNF α en las iDCs estimuladas con BMP-4. Por el contrario, la secreción al medio de IL-1 β , al igual que la de IL-12p70, no se vieron afectadas por BMP-4 (Figura 10). Esta última fue producida a niveles muy bajos o indetectables en ambos tratamientos, control y BMP-4 (datos no mostrados).

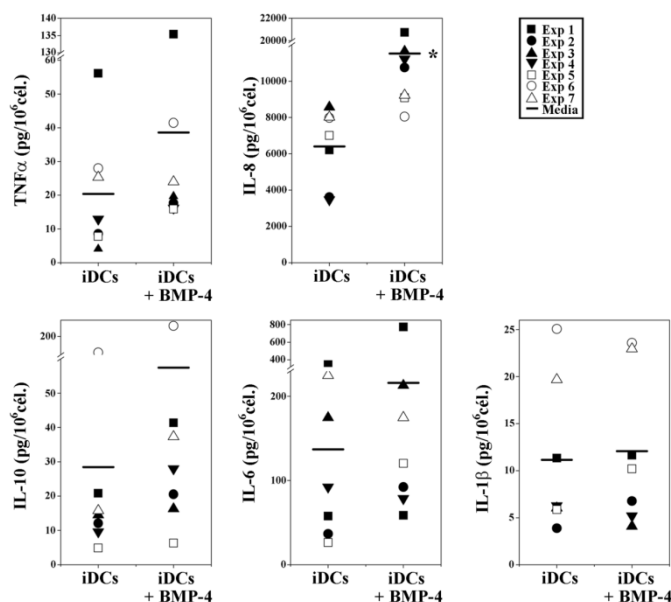


Figura 10. Producción de citoquinas por iDCs en respuesta a la estimulación de la vía de señalización BMP. Tras 6 días de diferenciación, los sobrenadantes de iDCs antes y después de 36 horas de cultivo en presencia de BMP-4 (50 ng/ml) fueron recogidos y ensayados para la presencia de diferentes citoquinas mediante ELISA. Para cada citoquina, las gráficas de dispersión muestran las concentraciones determinadas en 7 experimentos independientes y el valor medio (* $p \leq 0,05$; mediante prueba t).

3.5 La capacidad aloestimuladora de las iDCs es potenciada tras la estimulación de la vía de señalización BMP

Continuando con la caracterización funcional de las iDCs tras la estimulación de la vía de señalización BMP, se llevó a cabo el co-cultivo con linfocitos T CD4⁺ vírgenes alogénicos para evaluar su capacidad aloestimuladora. A los 6 días de co-cultivo se pudo observar que las iDCs estimuladas con BMP-4, al igual que las mDCs, eran más eficientes en inducir la respuesta proliferativa de los linfocitos T que las iDCs que no habían sido tratadas (Figura 11A). Así, cuando $5 \cdot 10^4$ DCs estimuladas con BMP-4 fueron usadas como células estimuladoras, la respuesta proliferativa de los linfocitos T fue el doble que la inducida por las iDCs control.

De forma consecuente con los resultados anteriores, los niveles de IFN γ secretados al medio en los co-cultivos DC-linfocito T se vieron incrementados al usar como células estimuladoras iDCs cultivadas en presencia del ligando BMP-4 en

comparación con las no tratadas (Figura 11B). En cambio, no hubo diferencias remarcables sobre la producción de IL-10, IL-4 e IL-12p70 en esos co-cultivos.

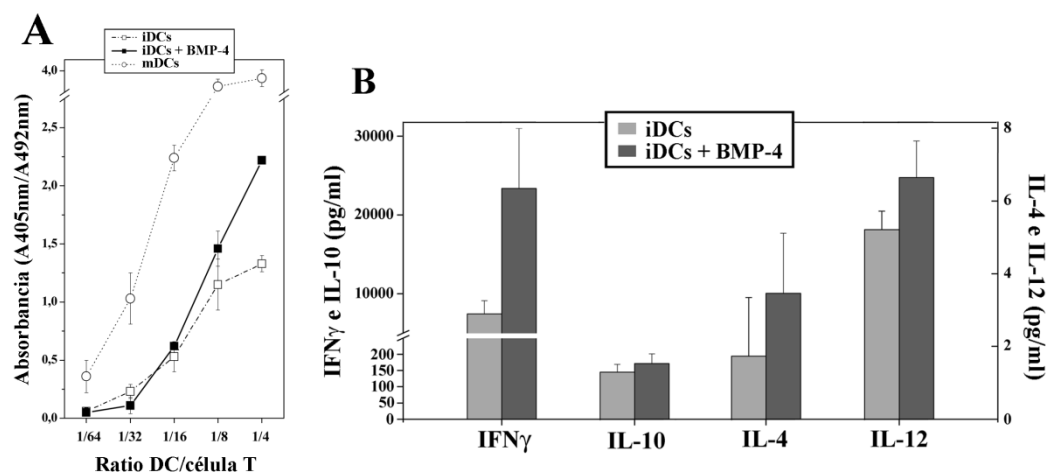


Figura 11. La estimulación de la vía de señalización BMP aumenta la capacidad de las iDCs para estimular células T. Tras 36 horas de cultivo en ausencia de tratamiento (iDCs) o en presencia de BMP-4 (iDC + BMP-4) o LPS (mDCs), las DCs fueron empleadas para estimular células T CD4⁺ vírgenes alogénicas a los ratios DC/célula T indicados. (A) Después de 5 días de co-cultivo, se adicionó BrdU al medio y tras 12 horas la cantidad de BrdU incorporada en el DNA sintetizado de novo fue determinada con un kit específico. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. (B) Adicionalmente, los sobrenadantes de los co-cultivos con el ratio DC/célula T más alto fueron recogidos a los 6 días y ensayados para los niveles de diferentes citoquinas mediante ELISA. La gráfica muestra la media \pm desviación estándar de 2 experimentos independientes.

3.6 La señalización BMP regula la expresión de los genes *RUNX* en las iDCs

Los factores de transcripción *RUNX* son habitualmente descritos como diana de la vía de señalización BMP, e incluso se ha demostrado que las proteínas *RUNX* y las BR-Smad pueden interaccionar físicamente al activar la señalización BMP y, de forma cooperativa, regular la transcripción de diferentes genes diana^{21,174}. Por otro lado, se ha propuesto que *RUNX3* podría participar en la adquisición del fenotipo maduro, además de otras características funcionales, que tienen lugar durante el proceso de maduración de las DCs¹⁷⁵⁻¹⁷⁸. Por lo tanto, se investigó si los componentes de la familia *RUNX* podrían estar relacionados con los efectos de la activación de la vía de señalización BMP sobre la adquisición de características maduras en las iDCs. Para ello, iDCs fueron cultivadas en presencia o ausencia de BMP-4 durante 1 hora y se analizó por RT-PCR cuantitativa en tiempo real la tasa transcripcional de los factores de transcripción *RUNX*. Como muestra la Figura 12A, las iDCs incrementaron la expresión de los tres

componentes de la familia RUNX en respuesta a la estimulación con BMP-4. De forma muy similar, al realizar el estudio comparativo entre iDCs y mDCs de la expresión de los genes *RUNX*, se pudo observar que el proceso de maduración de las DCs va acompañado de un incremento notable en la expresión de los tres miembros de la familia de factores de transcripción RUNX, fundamentalmente RUNX2 y RUNX3 (Figura 12B).

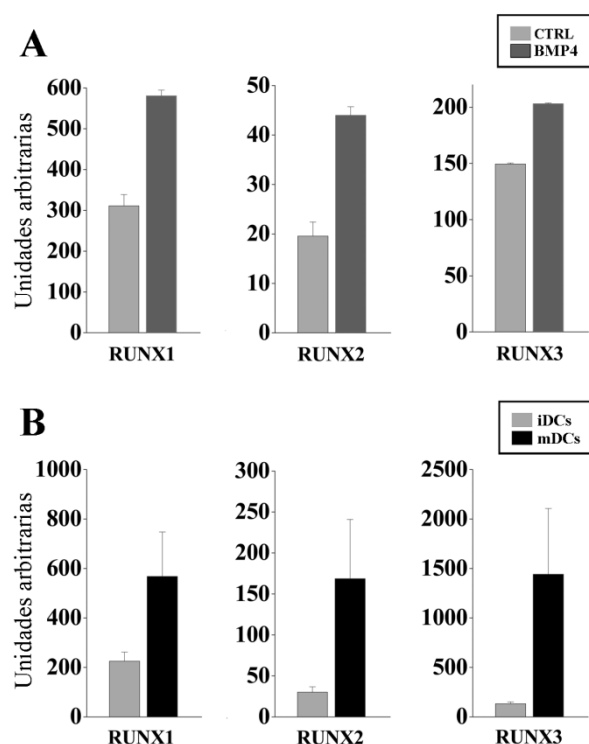


Figura 12. Regulación de la expresión de los genes *RUNX* por la activación de la vía de señalización BMP. (A) Análisis por RT-PCR cuantitativa a tiempo real de los niveles de ARNm para *RUNX1*, *RUNX2* y *RUNX3* en iDCs estimuladas (BMP4) o no (CTRL) con BMP-4 durante 1 hora. Los resultados muestran un experimento representativo de 3 independientes. (B) Alternativamente, la expresión de los genes *RUNX* fue analizada por RT-PCR cuantitativa a tiempo real en mDCs y comparada a los niveles de las iDCs. Los resultados muestran la media \pm desviación estándar de 6 experimentos independientes. En ambos casos (A y B) los datos mostrados se refieren a la expresión normalizada frente a la de GAPDH.

4. EFECTOS DE LA ACTIVACIÓN EXÓGENA DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN BMP EN LA MADURACIÓN DE LAS DCs

4.1 La estimulación exógena de la vía de señalización BMP no modifica la expresión de marcadores de maduración en las mDCs

Una vez demostrado que la iDCs eran capaces de adquirir una serie de características de células maduras en respuesta a la estimulación con un ligando BMP, la siguiente cuestión fue si las BMPs podría seguir regulando la expresión de diferentes marcadores en las DCs tras el proceso madurativo. Para responder a esta pregunta, las mDCs generadas tras el cultivo con el cóctel de citoquinas pro-inflamatorias fueron

estimuladas con BMP-4 y las posibles alteraciones producidas en el fenotipo fueron estudiadas por citometría de flujo a las 36 horas. Como muestra la Figura 13, la presencia de BMP-4 en el medio dio lugar únicamente a ligeros incrementos en la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 y CD86, mientras que la expresión del resto de marcadores de maduración estudiados no se vio modificada.

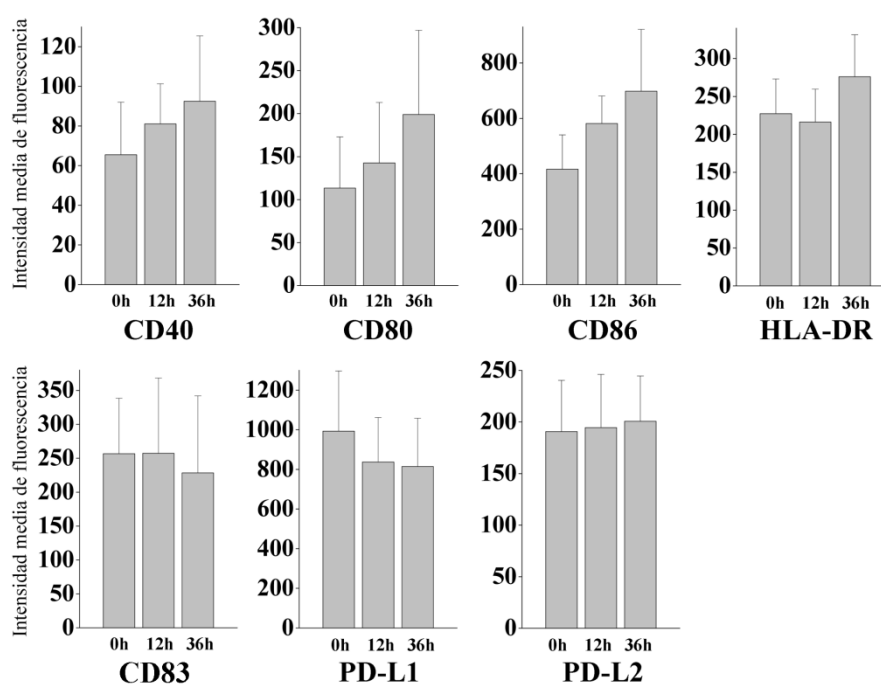


Figura 13. Análisis fenotípico del tratamiento con BMP en mDCs. Tras 6 días de diferenciación, mDCs fueron generadas tras la estimulación durante 36 horas con el cóctel de citoquinas pro-inflamatorias. Una vez maduras, las mDCs fueron tratadas durante 36 horas adicionales con BMP-4 (50 ng/ml) y la expresión de diferentes marcadores de maduración fue determinada por citometría de flujo antes y después del tratamiento. Las barras representan la media \pm desviación estándar de las intensidades medias de fluorescencia de 3-6 experimentos independientes.

4.2 La adición exógena de BMP-4 durante la maduración de las DCs no modifica la adquisición del fenotipo maduro

A continuación investigamos el posible efecto de la estimulación exógena de la vía de señalización BMP durante el proceso de maduración inducido por citoquinas pro-inflamatorias. Para ello, el cóctel de citoquinas empleado para inducir la maduración de las iDCs fue suplementado o no con BMP-4 y, tras 36 horas de estimulación, el fenotipo de las mDCs generadas fue analizado por citometría de flujo. Como muestra la Figura

14, ninguno de los marcadores analizados en el estudio fenotípico mostró diferencias a causa de la adición exógena de BMP-4 durante la generación de las mDCs.

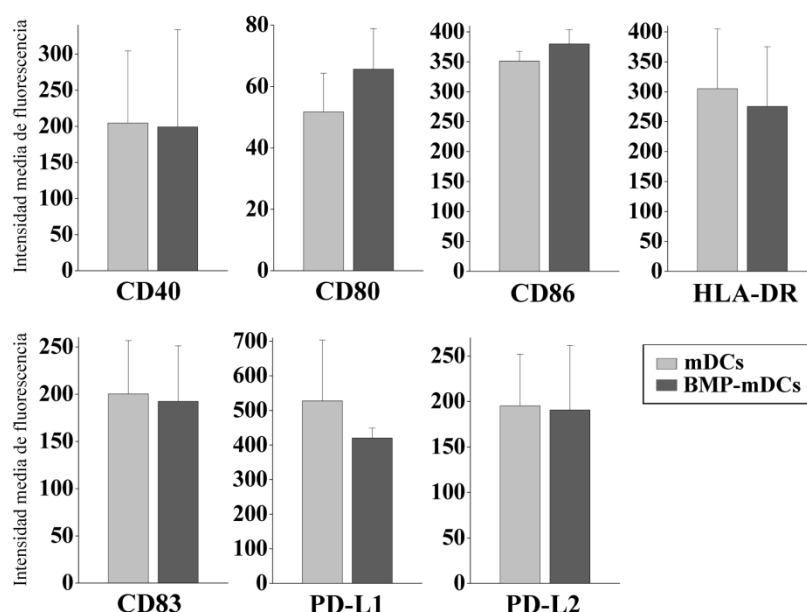


Figura 14. Análisis fenotípico del tratamiento con BMP durante la maduración de las DCs. iDCs fueron estimuladas durante 36 horas con un cóctel de citoquinas pro-inflamatorias solo (mDCs) o suplementado con BMP-4 (BMP-mDCs) y la expresión de marcadores de maduración fue analizada por citometría de flujo. Los resultados muestran la media \pm desviación estándar de las intensidades medias de fluorescencia de al menos 2 experimentos independientes.

5. LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN BMP SE ACTIVA DURANTE LA MADURACIÓN DE LAS DCs

5.1 Las MoDCs producen ligandos BMP

Nuestros resultados demostraban que la estimulación exógena de la ruta de señalización BMP inducía la maduración de las iDCs. Por otro lado, diversos autores habían descrito previamente que los diferentes componentes del cóctel de citoquinas pro-inflamatorias (TNF α , IL-1 β , IL-6 y PGE2), usado para generar mDCs en nuestro sistema, son capaces de estimular la producción de BMP en diferentes tipos celulares^{53,103,179-181}. Ambos hechos nos llevaron a estudiar la posible existencia de una producción endógena de ligandos BMP por parte de las MoDCs durante el proceso de maduración inducido por el cóctel pro-inflamatorio. Inicialmente comenzamos el

estudio centrándonos en el ligando BMP-4, que es uno de los ligandos BMP más estudiados en cuanto a su relación con los sistemas inmunitario y hematopoyético. Mediante RT-PCR se confirmó la presencia del transcrito de *BMP4* en iDCs y mDCs pero no en monocitos (Figura 15A). Para confirmar la producción y posterior secreción al medio de BMP-4, se determinaron por ELISA los niveles de BMP-4 en sobrenadantes de monocitos, iDCs y mDCs. De nuevo, los resultados del ELISA mostraron que los monocitos, en ausencia de factores de crecimiento, no son capaces de producir BMP-4 (Figura 15B). Por el contrario, en todos los sobrenadantes de DCs ensayados fue posible detectar la presencia de la proteína BMP-4, estando aumentados en más de un 50% sus niveles en los cultivos de mDCs respecto a los de iDCs.

Para determinar si además de BMP-4 otros BMPs eran inducidos como consecuencia del proceso de maduración, se analizó por RT-PCR cuantitativa en tiempo real la expresión de los genes que codifican para otros ligandos BMP que también se ha descrito que están implicados en el sistema inmunitario, como BMP-2, BMP-6 y BMP-7. Como puede observarse en la Figura 15C, la expresión de *BMP2* y *BMP6* experimentó un aumento considerable, de 4 y 7 veces respectivamente, tras la estimulación de las iDCs con el cóctel pro-inflamatorio. Al contrario del resto de ligandos BMP analizados, la expresión de *BMP7* resultó disminuida tras el proceso de maduración de las DCs.

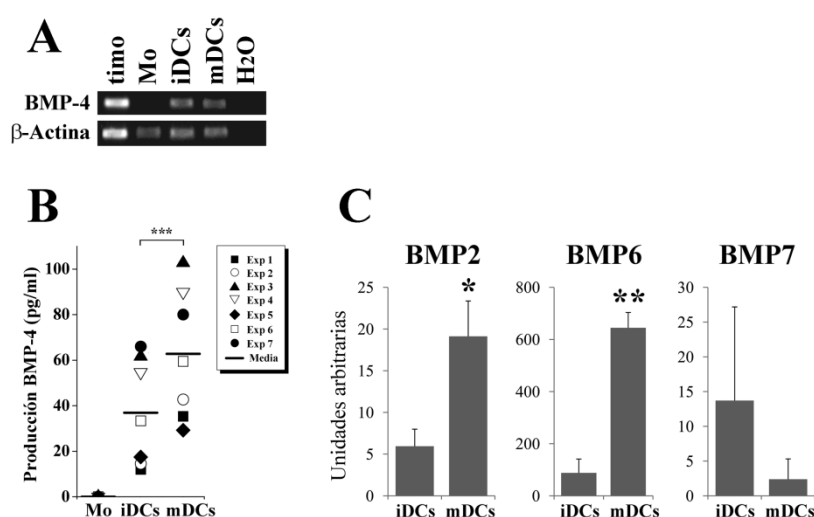


Figura 15. Las MoDCs producen BMPs. (A) Análisis por RT-PCR de la expresión de *BMP4* en monocitos, iDCs y mDCs. H₂O y células totales de timo fueron empleadas como control negativo y positivo respectivamente. (B) Sobrenadantes de monocitos cultivados durante 36 horas en ausencia de factores de crecimiento, iDCs y mDCs fueron ensayados para la secreción de BMP-4 al medio mediante ELISA. Los

resultados representan 7 experimentos independientes más la media (***) $p \leq 0,005$; mediante prueba t). (C) Determinación de los niveles de ARNm de *BMP2*, *BMP6* y *BMP7* en iDCs y mDCs mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real. Los datos mostrados se refieren a la expresión normalizada frente a la de *GNB2L1*. Las barras representan la media \pm desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; mediante prueba t).

5.2 La vía canónica de señalización BMP se activa durante el proceso de maduración de las MoDCs

A tenor de los resultados obtenidos que mostraban un incremento en la producción de BMP-4 tras la maduración de las DCs, se trató de profundizar en el estado de activación de la vía canónica de señalización BMP durante el proceso de maduración. Primeramente, se determinaron los niveles de producción de BMP-4 a lo largo de la maduración inducida por citoquinas pro-inflamatorias. Durante el cultivo con el cóctel de citoquinas a lo largo de 36 horas, los niveles de BMP-4 secretado al medio siguieron una cinética ascendente con un pico máximo a las 12 horas de estimulación que se mantuvo estable hasta el final del proceso (Figura 16A).

Seguidamente, se investigó si el ligando BMP-4 liberado al medio era capaz de señalizar de forma autocrina/paracrina en las propias DCs. Como muestran los resultados, el proceso de maduración inducido por citoquinas pro-inflamatorias fue acompañado de un aumento en los niveles de Smad-1/5/8 fosforilada (Figura 16B), llegando a duplicarse dichos niveles a las 12 horas de cultivo con el cóctel pro-inflamatorio y confirmando, de esta forma, que la maduración de las iDCs inducida por citoquinas pro-inflamatorias conlleva la activación de la vía canónica de señalización BMP.

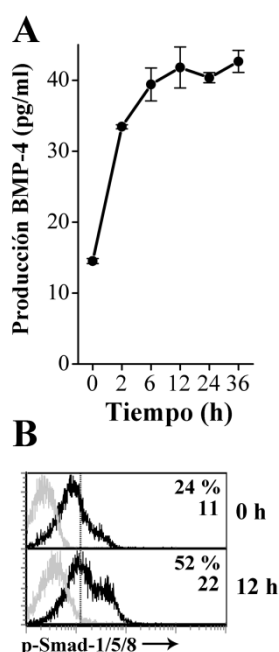


Figura 16. La vía de señalización BMP se activa durante el proceso de maduración de las MoDCs. (A) Los sobrenadantes de DCs estimuladas con un cóctel de citoquinas pro-inflamatorias fueron recogidos en los tiempos indicados a lo largo de 36 horas de cultivo para la determinación mediante ELISA de los niveles de BMP-4 secretados al medio. Los resultados representan un experimento representativo de 7 independientes. (B) Los niveles de Smad-1/5/8 fosforiladas fueron determinados en DCs mediante citometría de flujo antes y después de 12 horas de estimulación con un cóctel de citoquinas pro-inflamatorias. Como control negativo la tinción fue realizada con los anticuerpos pre-adsorbidos con el péptido bloqueante (perfiles grises). Un experimento representativo de 3 independientes es mostrado. El porcentaje de células positivas y la intensidad media de fluorescencia son indicados en cada histograma.

5.3 La vía de señalización de la p38 MAPK tiene un papel crítico en la inducción de la producción de BMPs durante la maduración de las DCs

El proceso de maduración de las iDCs supone la participación orquestada de diferentes vías de señalización. Puesto que la expresión de las proteínas BMP se induce durante dicho proceso, quisimos averiguar cuál de estas rutas podría estar regulando este fenómeno. Para ello, iDCs fueron maduras en presencia de los inhibidores específicos para nueve de las proteínas que se han implicado en este proceso. Puesto que la expresión a nivel transcripcional de *BMP6* sufre un incremento de gran magnitud tras el proceso de maduración de las DCs, se tomó el efecto de los diferentes inhibidores específicos sobre esta inducción como aproximación para evaluar la contribución de cada una de estas proteínas a la inducción de los ligandos BMP. Tras 4 horas de maduración en presencia de cada inhibidor específico, la expresión del gen que codifica para BMP6 fue analizada por RT-PCR cuantitativa en tiempo real y comparada a su expresión en la situación control. Como muestra la Figura 17, el bloqueo de las proteínas quinasas MEK/Erk, JNK, src y del factor de transcripción NFAT no alteró la expresión de *BMP6* inducida durante la maduración de las DCs, mientras que la adición de wortmanina, compuesto inhibidor de la PI3K, tuvo como consecuencia un aumento en dicha inducción. Por otro lado, la inhibición del factor de transcripción NF-KB y de las proteínas CaMKII y PKC dio como resultado una ligera disminución en los niveles del transcrito de *BMP6*. Por último, la proteína p38 MAPK fue la que parecía ejercer un papel más crítico sobre la regulación de la inducción de los ligandos BMP, puesto que su bloqueo disminuyó de forma considerable la expresión del gen estudiado. Concretamente, la adición del compuesto inhibidor de la p38 MAPK redujo la expresión de *BMP6* en un 62% respecto al control. Es más, la inhibición de la p38 MAPK también tuvo un efecto negativo sobre la expresión de *BMP2*, reduciendo los niveles de su transcrito un 90% respecto al control (datos no mostrados).

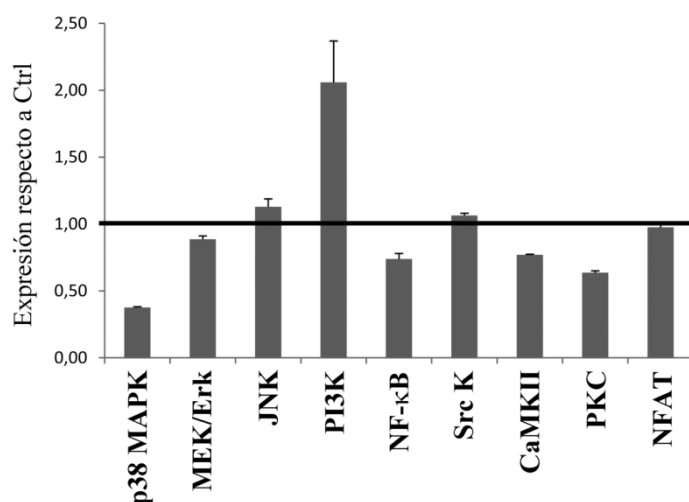


Figura 17. Regulación de la expresión de ligandos BMP inducida en MoDCs por la estimulación con citoquinas pro-inflamatorias. iDCs fueron estimuladas durante 4 horas con un cóctel de citoquinas pro-inflamatorias solo (control) o en presencia de los inhibidores específicos de las proteínas que se indican. Los niveles de transcrito de BMP6 fueron determinados por RT-PCR cuantitativa a tiempo real y normalizados frente a los de GNB2L1. La gráfica muestra la expresión de BMP6 en cada tratamiento relativa a la de las células control (barra en $y=1$). Se muestra la media \pm desviación estándar de los duplicados de un experimento de 7 independientes.

6. PAPEL DE LA SEÑALIZACIÓN BMP AUTOCRINA/PARACRINA DURANTE LA MADURACIÓN DE LAS DCs

6.1 La vía canónica de señalización BMP participa en la regulación de los genes *ID* que se produce durante el proceso de maduración

Los genes *ID*, clásicamente descritos como genes diana de la señalización BMP, han sido implicados en el proceso de diferenciación y maduración de diferentes subpoblaciones de DCs¹⁸²⁻¹⁸⁴. Como ya se ha comentado anteriormente, la estimulación de la vía de señalización BMP fue capaz de inducir la expresión de las proteínas IDs en MoDCs (Figura 4), por lo que se trató de estudiar el posible papel de la señalización BMP canónica en el control de la expresión de los genes *ID* durante la maduración de las DCs. Primeramente se analizó si la DM era capaz de bloquear la activación de la vía canónica de señalización BMP inducida durante la maduración de las MoDCs. Efectivamente, tras 36 horas de estimulación, los niveles de Smad-1/5/8 fosforiladas de las DCs maduras en presencia de DM (DM-mDCs) estaban reducidos respecto a las maduras en situación control (mDCs) (Figura 18A). A continuación, se estudió el patrón de expresión de estos factores a nivel de transcrito durante el proceso de maduración de las MoDCs. Mediante RT-PCR cuantitativa en tiempo real se pudo observar cómo la transcripción de *ID1* e *ID3* disminuía durante la maduración, llegando

a apagarse prácticamente por completo en el caso de *ID3* (Figura 18B). De forma contraria, los niveles de *ID2* experimentaron un aumento paulatino llegando a ser 7 veces superiores en mDCs respecto a iDCs. Finalmente se compararon los niveles de expresión de estos genes en DCs cuya maduración se había producido en presencia o ausencia del inhibidor DM. El bloqueo de la vía canónica de señalización BMP fue capaz de frenar la pérdida de expresión de *ID1* e *ID3*, puesto que ambos genes presentaron niveles de expresión por encima del control, siendo máxima esta diferencia a las 24 horas de estimulación (Figura 18C). De igual forma, la inducción de *ID2* mediada por el cóctel pro-inflamatorio se vio disminuida al inhibir la vía canónica de señalización BMP, llegando a reducirse los niveles de transcripción un 40% a las 24 horas de estimulación a causa del tratamiento con DM. Estas observaciones indican que la vía canónica de señalización BMP participaría en la modulación de la expresión de los genes *ID* durante el proceso de maduración de las DCs.

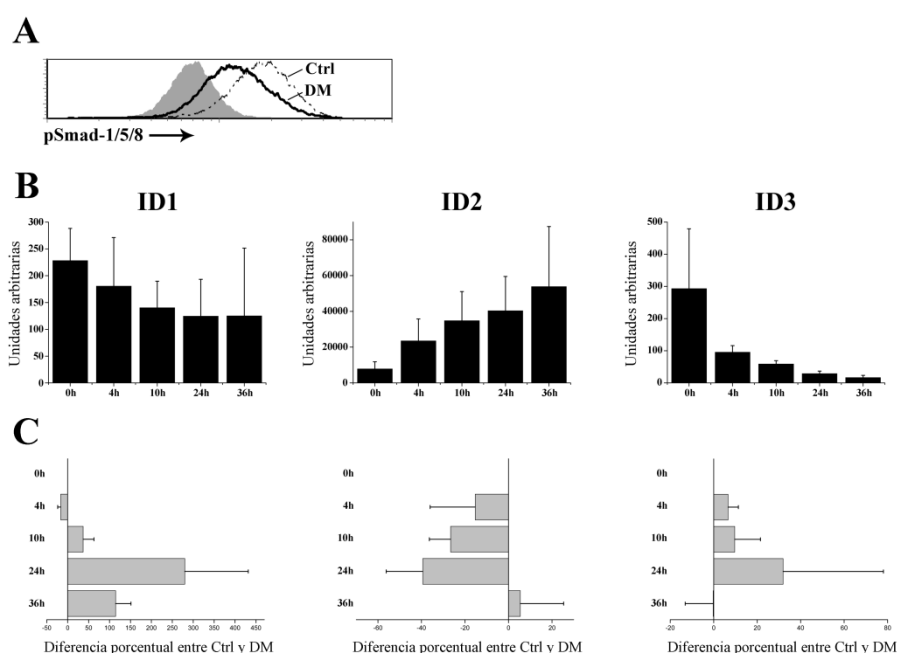


Figura 18. Efecto del bloqueo de la vía canónica de señalización BMP sobre las BR-Smads fosforiladas y los genes *ID* durante la maduración de las MoDCs. iDCs fueron estimuladas con un cóctel de citoquinas pro-inflamatorias en ausencia (Ctrl) o presencia del inhibidor DM (DM) y los niveles de Smad-1/5/8 fosforilada a 36 horas (A) y la expresión de *ID1*, *ID2* e *ID3* en los tiempos indicados (B) fueron analizados por citometría de flujo y RT-PCR cuantitativa a tiempo real respectivamente. (A) Como control negativo la tinción fue realizada con los anticuerpos pre-adsorbidos con el péptido bloqueante (histograma relleno). Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. (B) Las barras negras muestran la expresión de los genes *ID* en situación control. (C) Las barras grises representan la diferencia porcentual entre los niveles de expresión cuantificados en las células tratadas con DM y las células control maduras en paralelo. Las gráficas representan la media \pm desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. En ambos casos GNB2L1 fue empleado como control endógeno.

6.2 La vía canónica de señalización BMP regula la expresión de las proteínas PD-L1 y PD-L2 en las DCs

Una vez demostrado que la vía canónica de señalización BMP participa en el proceso de maduración de las DCs, nos propusimos estudiar qué papel podría jugar en uno de los fenómenos que acompañan a este proceso como es la adquisición del fenotipo maduro. Primeramente se analizó el efecto de la DM sobre la inducción de la expresión de diferentes marcadores de maduración. La presencia DM prácticamente no afectó al incremento en la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 y CD86, así como de HLA-DR y CD83, o a la reducción en la expresión de MMR (datos no mostrados). Por el contrario, sí que produjo un bloqueo altamente significativo en la expresión de los ligandos PD-L1 y PD-L2 (Figura 19A y B). El efecto inhibitor de la DM sobre la inducción de los ligandos PD-L1 y PD-L2 durante la maduración fue dosis dependiente (Figura 19C, paneles izquierdos) y no podía ser atribuido a un efecto tóxico del tratamiento, dado que ninguna de las dosis ensayadas incrementó el porcentaje de células apoptóticas (Figura 19C, panel derecho).

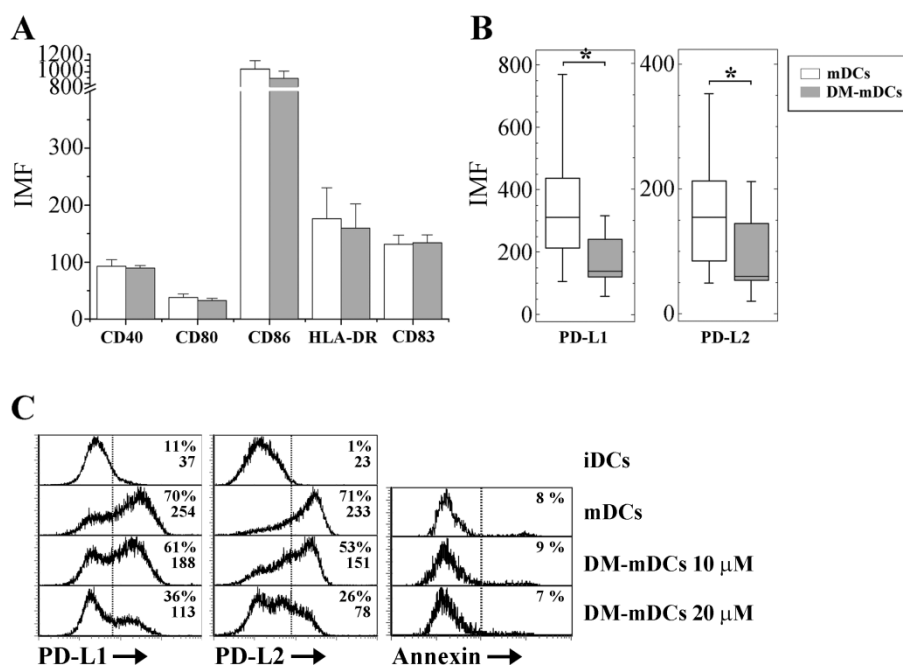


Figura 19. Regulación de la expresión de PD-L1 y PD-L2 por la vía canónica de señalización BMP durante la maduración de las MoDCs. Las DCs maduraron durante 36h en presencia (DM-mDCs) o ausencia (mDCs) de DM 20 μ M y fueron posteriormente empleadas para su estudio por citometría de flujo. (A) Expresión de diferentes marcadores de maduración representada como la media \pm desviación estándar de la intensidad media de fluorescencia de 10 experimentos independientes. (B) Expresión de PDL-1 y PDL-2. Las gráficas de cajas y bigotes muestran la mediana, los cuartiles y el ratio mínimo y

máximo de la intensidad media de fluorescencia de al menos 13 experimentos independientes ($*p \leq 0,05$; mediante test de Mann-Whitney-Wilcoxon). (C) La maduración de las iDCs fue llevada a cabo con un cóctel de citoquinas solo o con las dosis indicadas de DM y la expresión de PD-L1 y PD-L2 y el porcentaje de células apoptóticas (panel derecho) fueron determinados por citometría de flujo. El porcentaje de células positivas y la intensidad media de fluorescencia son indicados en cada histograma. Las células apoptóticas fueron definidas como Anexina V positivas, iodo de propidio negativas.

Como ya se demostraba en la Figura 16, la señalización BMP se activa con la respuesta madurativa y se mantiene a lo largo del tiempo, encontrándose los niveles más altos de las BR-Smads fosforiladas en las DCs ya maduras. Para comprobar si la señalización BMP no solo mediaba la inducción de los ligandos de PD-1 durante la maduración, sino también su mantenimiento una vez alcanzado el estado maduro, se adicionó DM a DCs en estado maduro y se estudió su fenotipo tras 36 horas de cultivo. El bloqueo de la vía canónica de señalización BMP en las mDCs dio como resultado una disminución en la expresión de PD-L1 y PD-L2 respecto a los niveles iniciales del 43% y del 67%, respectivamente (Figura 20). De nuevo demostrando un efecto específico sobre PD-L1 y PD-L2, este tratamiento no afectó a la expresión del resto de marcadores estudiados.

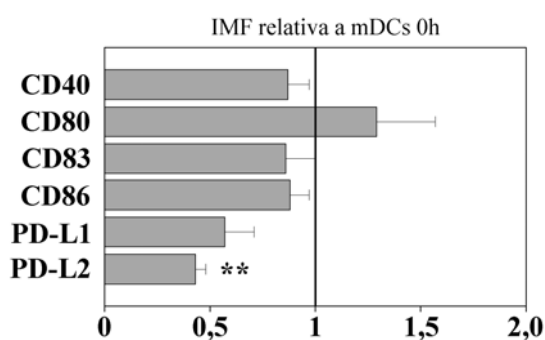


Figura 20. Regulación de la expresión de PD-L1 y PD-L2 por la vía canónica de señalización BMP en mDCs. mDCs generadas tras la estimulación con el cóctel de citoquinas pro-inflamatorias fueron cultivadas adicionalmente durante 36h en presencia de DM y la expresión de marcadores de maduración fue analizada por citometría de flujo antes (mDCs) y después del tratamiento. La intensidad media de fluorescencia (MFI) de las células tratadas relativa a las de las células que no recibieron ningún tratamiento (mDCs, línea en $x=1$) es mostrada. Las barras representan la media \pm desviación estándar de al menos 2 experimentos independientes ($**p \leq 0,01$, mediante prueba t).

Las proteínas de membrana PD-L1 y PD-L2 son ligandos de la proteína PD-1 e intervienen en la interacción inmunológica entre las DCs y los linfocitos T, enviando señales inhibitoras a éstos últimos. Su papel represor actúa como un mecanismo de regulación de la respuesta inmunitaria creándose, junto con las señales co-estimuladores, un balance entre señales activadoras e inhibitoras. Por lo tanto, un cambio que afecte únicamente a las señales represoras podría causar un desbalance que resultaría en última instancia en la alteración de la capacidad inmunogénica de las DCs.

Como muestra la Tabla 1, al calcular los ratios entre ambas señales inhibitoras y el resto de señales co-estimuladoras, se observó cómo la presencia de DM durante la maduración modificó el balance inhibitor/activador, generando unas mDCs con un perfil fenotípico de carácter más activador, lo cual, teóricamente, podría conferir a estas células una mayor capacidad inmunogénica.

		mDCs	DM-mDCs
ratio PD-L1/molécula co-estimuladora	CD40	3.8 ± 0.73	2.44 ± 0.53 **
	CD80	8.56 ± 1.22	5.69 ± 0.79 **
	CD86	0.21 ± 0.02	0.16 ± 0.02 **
ratio PD-L2/molécula co-estimuladora	CD40	1.82 ± 0.27	1.09 ± 0.18 ***
	CD80	4.48 ± 0.54	3.06 ± 0.49 ***
	CD86	0.12 ± 0.02	0.09 ± 0.02 **

Tabla 1. El bloqueo de la vía de señalización BMP durante el proceso de maduración de las DCs disminuye el ratio de moléculas co-inhibidoras frente a moléculas co-estimuladoras. iDCs fueron cultivadas durante 36 horas con un cóctel de citoquinas pro-inflamatorias solo (mDCs) o suplementado con DM (DM-mDCs) y la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD40, CD80, CD86 y las moléculas inhibitoras PD-L1 y PD-L2 fue analizada por citometría de flujo. La tabla muestra los ratios de la intensidad media de fluorescencia entre PD-L1 o PD-L2 y cada molécula co-estimuladora. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de 10 experimentos independientes (** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; mediante prueba t).

6.3 El bloqueo de vía canónica de señalización BMP no altera la producción de citoquinas durante la maduración de las DCs

Como otra característica propia del proceso madurativo de las DCs, se estudió si la producción de citoquinas por las mDCs podría verse afectada por el bloqueo de la señalización canónica BMP. Para ello, los sobrenadantes de DM-mDCs y mDCs fueron ensayados para la determinación de los niveles de citoquinas que no estaban presentes en el cóctel de maduración. Tras 36 horas de estimulación con citoquinas pro-inflamatorias, aparte de un leve incremento en los niveles de IL-10, la presencia de DM en el medio no modificó los niveles de las citoquinas IL-12 e IL-8 respecto a la situación control (Figura 21).

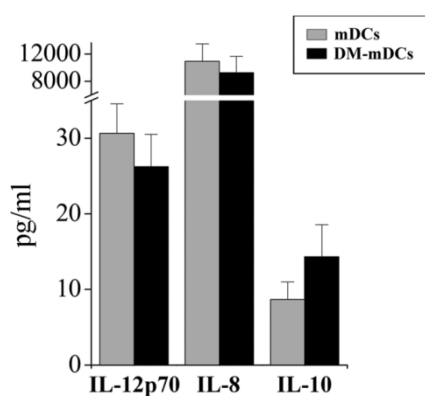


Figura 21. La producción de citoquinas por mDCs no se ve afectada por el bloqueo de la vía canónica de señalización BMP. Los sobrenadantes de células maduras en presencia (DM-mDCs) o ausencia (mDCs) de DM 20 μ M fueron recogidos tras 36 horas de estimulación y ensayados para la determinación de los niveles de IL-12p70, IL-8 e IL-10 mediante ELISA. La media \pm desviación estándar de 9 experimentos independientes es mostrada.

6.4 La capacidad aloestimuladora de las mDCs se potencia al bloquear la vía canónica de señalización BMP durante su maduración

Siguiendo con la caracterización funcional de las DM-mDCs, se analizó la capacidad aloestimuladora de estas células. El co-cultivo con linfocitos T CD4⁺ vírgenes alogénicos dio como resultado un incremento en la respuesta proliferativa inducida en los linfocitos T al emplear DM-mDCs como células estimuladoras (Figura 24A y B). Este resultado confirmaría el mayor carácter inmunogénico de las DM-mDCs que fue inferido a partir del estudio fenotípico anteriormente comentado.

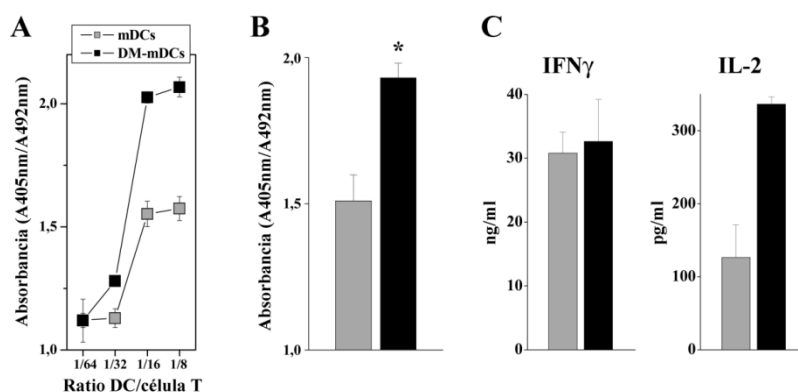


Figura 22. El bloqueo de la vía canónica de señalización BMP durante la maduración de las DCs potencia la capacidad de las mDCs para estimular a células T. mDCs generadas tras la estimulación con un cóctel de citoquinas solo (mDCs, cuadrados y barras grises) o suplementado con DM (DM-mDCs, cuadrados y barras negras) fueron cultivadas con linfocitos T CD4⁺ vírgenes alogénicos a diferentes ratios. Durante las 12 últimas horas de los 6 días de co-cultivo se adicionó BrdU al medio y la cantidad de BrdU incorporada en el ADN sintetizado de novo fue determinada mediante un kit específico. Los resultados muestran un experimento representativo (A) y la media \pm desviación estándar del ratio 1/8 mDC-linfocito T de 3 experimentos independientes (B) (* $p \leq 0,05$; mediante prueba t). (C) Los sobrenadantes de los co-cultivos fueron recogidos a los 6 días y ensayados para los niveles de IFN γ e IL-2 mediante ELISA. Las barras muestran la media \pm desviación estándar de 2 experimentos independientes.

De forma paralela, los sobrenadantes de los co-cultivos mDC-linfocito T fueron empleados para la determinación de niveles de citoquinas, encontrándose que, de forma coherente con los datos de proliferación, las DM-mDCs indujeron una producción de IL-2 muy por encima de la inducida por las mDCs (Figura 24C). Por otro lado, y de forma inesperada, los niveles de IFN γ secretados no se vieron aumentados como sería previsible cuando DM-mDCs fueron empleadas como estimuladoras (Figura 24C).

6.5 El bloqueo de la ruta canónica de señalización BMP durante la maduración de las MoDCs aumenta su capacidad para activar células NK

En los últimos años, se ha enfatizado de forma considerable el papel de la interacción entre células NK y DCs como parte de la regulación de la inmunidad innata y de las fases tempranas de la subsiguiente respuesta inmunitaria adaptativa¹⁸⁵. Por este motivo quisimos estudiar si la mayor capacidad estimuladora adquirida por las mDCs como consecuencia de la inhibición de la vía canónica de señalización BMP durante el proceso de maduración podría afectar a esta interacción. Tras 14 horas de co-cultivo, las DM-mDCs indujeron de forma más eficiente la capacidad citotóxica de las células NK autólogas contra la línea tumoral K562, llegando a aumentar el porcentaje de citotoxicidad específica hasta un 40% respecto a las células NK cultivadas con mDCs (Figura 23A). Estos resultados reflejan una capacidad aumentada de las DM-mDCs para estimular la actividad citotóxica de las células NK. Sin embargo, los niveles de IFN γ determinados en los sobrenadantes tras el co-cultivo mDCs-células NK fueron inferiores cuando DM-mDCs fueron empleadas como células estimuladoras (Figura 23B).

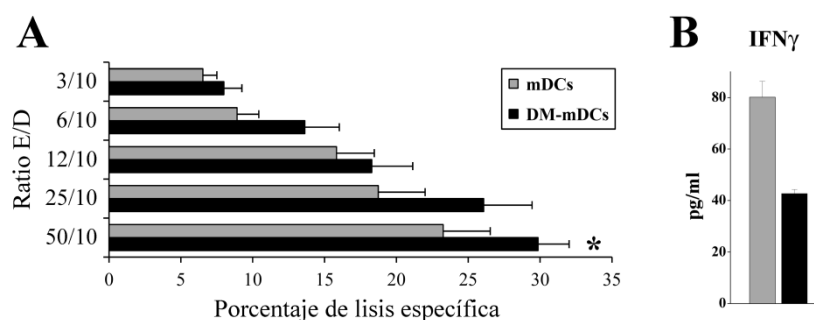


Figura 23. El tratamiento con DM durante la maduración de las DCs incrementa su capacidad para activar a las células NK. Células NK fueron cultivadas con mDCs autólogas maduras en ausencia (mDC + NKs) o presencia (DM-mDCs + NKs) de DM. (A) Tras 24 horas, las células NK fueron recolectadas y co-cultivadas con la línea tumoral K562 a diferentes ratios célula efectora/célula diana (E/D). El porcentaje de lisis específica fue determinado a las 4 horas a partir de la actividad lactato deshidrogenasa detectada en el sobrenadante de los co-cultivos. La gráfica muestra la media \pm desviación estándar de 4 experimentos independientes. * $p \leq 0,05$; mediante prueba t. (B) De forma paralela, los sobrenadantes de los co-cultivos mDC-célula NK fueron ensayados para IFN γ mediante ELISA. Las barras representan la media \pm desviación estándar de 2 experimentos independientes.

6.6 La vía canónica de señalización BMP regula la expresión del factor de transcripción IRF-1 durante la maduración de las DCs

La familia de factores de transcripción IRF se ha revelado como un conjunto de proteínas reguladoras con un papel crucial en diferentes aspectos de la biología de las DCs^{186,187}. Más concretamente, se ha demostrado que componentes de esta familia participan de forma activa en el proceso de maduración ya sea vía TLR¹⁸⁶ o tras la estimulación con factores pro-inflamatorios como TNF α y PGE2¹⁸⁸. Uno de los miembros de esta familia, IRF1, ha sido propuesto como un factor esencial para la expresión inducida del ligando PD-L1¹⁸⁹. Dado que el bloqueo de la vía canónica de señalización BMP durante la maduración de las DCs afecta principalmente a la expresión de PD-L1 y PD-L2, nos propusimos investigar si el efecto observado podría estar mediado por un cambio en los niveles del factor de transcripción IRF1. El análisis por RT-PCR cuantitativa en tiempo real reveló que los niveles del transcrito de *IRF1* en DM-mDCs se encontraban reducidos a casi la mitad respecto a los observados en la situación control (Figura 24A). Por el contrario, el tratamiento con DM no alteró los niveles del transcrito de *IRF8*, factor de transcripción que al igual que IRF1 es inducido y participa en el proceso de maduración. En coherencia con los niveles de transcrito, el análisis por citometría de flujo de la expresión de la proteína IRF1 mostró que el tratamiento con DM disminuía de forma considerable, y dosis-dependiente, los niveles de este factor de transcripción (Figura 24B). El bloqueo de la vía canónica de

señalización BMP llegó a reducir a más de la mitad el porcentaje de células con una alta expresión de IRF1 cuando la dosis mayor de DM fue ensayada. Para comprobar si la expresión de PD-L1 y PD-L2 estaba regulada de forma directa por IRF1 en las DCs, se empleó la técnica de nucleofección con siRNAs con el objetivo de silenciar la expresión de IRF1. Tras la nucleofección con los correspondientes siRNAs, las iDCs fueron estimuladas con el cóctel de citoquinas pro-inflamatorias y a las 36 horas los niveles del ARNm de IRF1 fueron determinados por PCR cuantitativa a tiempo real, observándose una reducción en la expresión de IRF1 de aproximadamente el 50% en aquellas células nucleofectadas con el siRNA específico de IRF1 respecto a las células control (Figura 24C). Asimismo, el silenciamiento de IRF1 previo a la maduración de las iDCs dio como resultado una reducción en la expresión de PD-L1 y PD-L2, mientras que el resto de marcadores analizados no fueron afectados (Figura 24D y E).

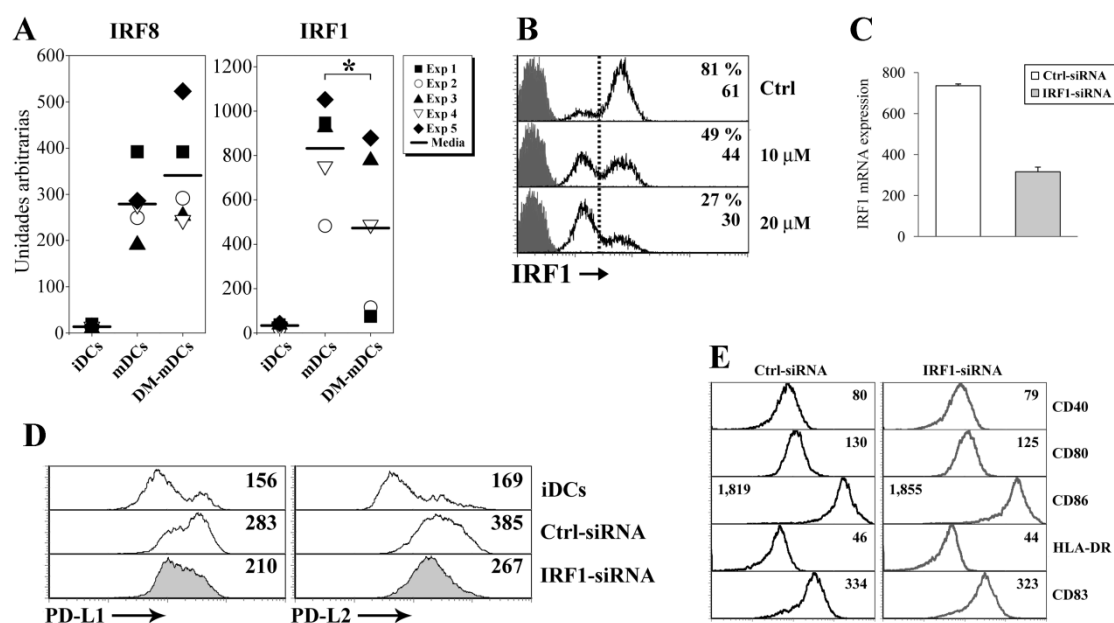


Figura 24. Implicación de IRF1 en la modulación de PD-L1 y PD-L2 a cargo de la vía de señalización BMP. (A) Análisis por RT-PCR cuantitativa a tiempo real de la expresión de IRF8 e IRF1 en iDCs y mDCs maduras tras la estimulación con un cóctel de citoquinas pro-inflamatorias solo (mDCs) o suplementado con DM (DM-mDCs). Los datos mostrados se refieren a la expresión normalizada frente a la de GAPDH. Para cada gen, las gráficas de dispersión muestran 5 experimentos independientes más el valor medio (* $p \leq 0,05$; mediante prueba t). (B) iDCs fueron maduras con el cóctel de citoquinas solo (Ctrl) o con las dosis indicadas de DM y los niveles de la proteína IRF1 fueron determinados por citometría de flujo. El porcentaje de células que expresan altos niveles de IRF1 y la intensidad media de fluorescencia son indicados en cada histograma. (C-E) iDCs fueron nucleofectadas con un ARN de interferencia control (Ctrl-siRNA) o específico de IRF1 (IRF1-siRNA) y maduras de forma estándar con el cóctel de citoquinas pro-inflamatorias. Tras 36 horas de estimulación, los niveles de IRF1 fueron determinados por PCR cuantitativa a tiempo real (C) y la expresión en membrana de PD-L1 y PD-L2 (D) y otros marcadores de maduración (E) fue analizada mediante citometría de flujo. La intensidad media de fluorescencia es mostrada en cada histograma. Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes

Al estudiar la cinética de expresión del gen *IRF1* a lo largo del proceso de maduración, se pudo observar cómo la presencia de DM durante la maduración de las DCs bloqueó casi por completo la inducción de *IRF1* durante las 10 primeras horas de estimulación (Figura 25A). Al igual que en la condición control, la cinética de expresión de *IRF1* en las DM-mDCs mostró un incremento entre las 24 y 36 horas, pero se mantuvo en todo momento por debajo de la expresión en las DCs control (Figura 25A). Estos resultados apuntaban a un efecto directo de la vía canónica de señalización BMP sobre la expresión de *IRF1*. Para analizar si *IRF1* podía ser considerado un gen diana de la vía canónica de señalización BMP en las DCs, iDCs fueron estimuladas durante una hora con BMP-4 y la expresión de *IRF1* se analizó por RT-PCR cuantitativa en tiempo real. En todos los individuos estudiados, la estimulación con BMP-4 dio como resultado un incremento modesto en la expresión de *IRF1* (Figura 25B). Dado que existía la posibilidad de que los niveles basales de señalización BMP autocrina pudiesen enmascarar el efecto de la adición exógena de BMP-4, la expresión de *IRF1* fue estudiada tras la adición de DM previamente a la estimulación con BMP-4. Efectivamente, la inhibición de la vía canónica de señalización BMP no solo bloqueó la expresión de *IRF1* inducida por BMP-4 sino que dicha expresión cayó más de un 40% respecto a la expresión basal de las células no tratadas (Figura 25B).

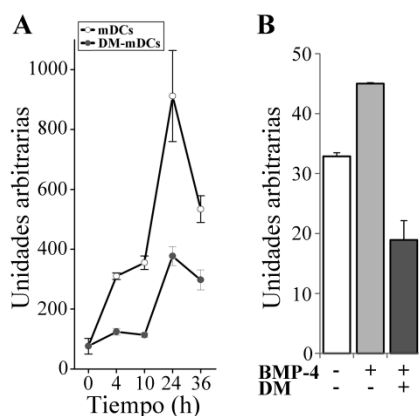


Figura 25. *IRF1* como gen diana de la vía de señalización BMP en DCs. (A) iDCs fueron estimuladas con un cóctel de citoquinas pro-inflamatorias en ausencia (mDCs) o presencia (DM-mDCs) del inhibidor DM y la expresión de *IRF1* fue analizada por RT-PCR cuantitativa a tiempo real en los tiempos indicados a lo largo de 36 horas. *GNB2L1* fue empleado como control endógeno. La gráfica muestra los resultados de un experimento representativo de 3 independientes. (B) iDCs fueron cultivadas durante 1 h en presencia de BMP-4 (100 ng/ml) solo (barra gris claro) o junto con el inhibidor DM 2 μ M (barra gris oscuro) y los niveles de ARNm de *IRF1* fueron analizados mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real. iDCs no tratadas fueron

empleadas para determinar los niveles basales de *IRF1* (barra blanca). Los datos mostrados se refieren a la expresión normalizada frente a la de *GAPDH*. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

6.7 La vía canónica de señalización BMP regula la expresión de PD-L1 y PD-L2 inducida por citoquinas pro-inflamatorias en las cDCs de sangre periférica también a través de *IRF1*

Finalmente, quisimos comprobar si el mecanismo de regulación de las proteínas PD-L1 y PD-L2 por parte de la vía canónica de señalización BMP observado en las MoDCs también estaba presente en otra población de DCs. De entre las diferentes poblaciones de DCs circulantes en humano, la población de cDCs BDCA-1⁺ (cDCs) es la única en la que se ha demostrado un incremento en la expresión de ligandos de PD-1 en respuesta al cóctel de citoquinas pro-inflamatorias empleado en nuestro sistema¹⁴⁸. Por lo tanto, nos propusimos averiguar si la vía canónica de señalización BMP también podría estar implicada en la expresión de PD-L1 y PD-L2 en las cDCs. Como primera aproximación se determinó la expresión de ligandos BMP en cDCs en respuesta a la estimulación con el mismo cóctel de citoquinas empleado con las MoDCs. Al igual que sucedía en MoDCs, la expresión de *BMP2* y *BMP6* por las cDCs se vio incrementada a consecuencia de la estimulación con el cóctel de citoquinas (Figura 26A). Este incremento, de hasta 40 veces en el caso de *BMP6*, no fue observado para *BMP7* cuya expresión, por el contrario, llegó a disminuir ligeramente.

Una vez demostrado que las citoquinas pro-inflamatorias inducen la expresión de ligandos BMP en cDCs, sumado al efecto positivo de la estimulación con BMP-4 sobre la expresión de PDL1 principalmente (Figura 26B), el siguiente paso fue analizar el efecto del bloqueo de la vía de señalización BMP sobre el fenotipo de la cDCs estimuladas. Como muestra la Figura 26C, el cultivo de las cDCs con el cóctel pro-inflamatorio fue capaz de inducir la expresión de PD-L1 y PD-L2, alcanzándose un 91% de células dobles positivas para estos marcadores. Sin embargo, el bloqueo de la señalización canónica BMP redujo de forma dosis dependiente dicha inducción, llegando a reducir el porcentaje de células dobles positivas a un 8% con la dosis más alta de DM ensayada (Figura 26C). De forma muy similar a los resultados obtenidos con las MoDCs, el efecto de la DM sobre la expresión de los PD-Ls en cDCs fue específico, puesto que ninguno de los restantes marcadores de maduración analizados fue alterado por el tratamiento (Figura 27D).

A continuación se estudió si, al igual que en las MoDCs, el bloqueo en la expresión de los PD-Ls podría deberse a una disminución en los niveles del factor de transcripción IRF1. Para responder a esta pregunta se determinaron por citometría de flujo los niveles de la proteína IRF1 en las cDCs tras la estimulación con el cóctel pro-

inflamatorio en presencia o ausencia de DM. La presencia del inhibidor durante la maduración de las cDCs redujo de forma considerable los niveles de IRF1 disminuyendo el porcentaje de células con una alta expresión de esta proteína de un 76% a un 30% con la dosis más alta de DM (Figura 26E). Este resultado sugiere que los efectos de la DM observados en el fenotipo de las cDCs podrían estar mediados por una disminución en la expresión del factor de transcripción IRF1 y que, por lo tanto, el mecanismo observado en MoDCs estaría funcionando también en este tipo celular.

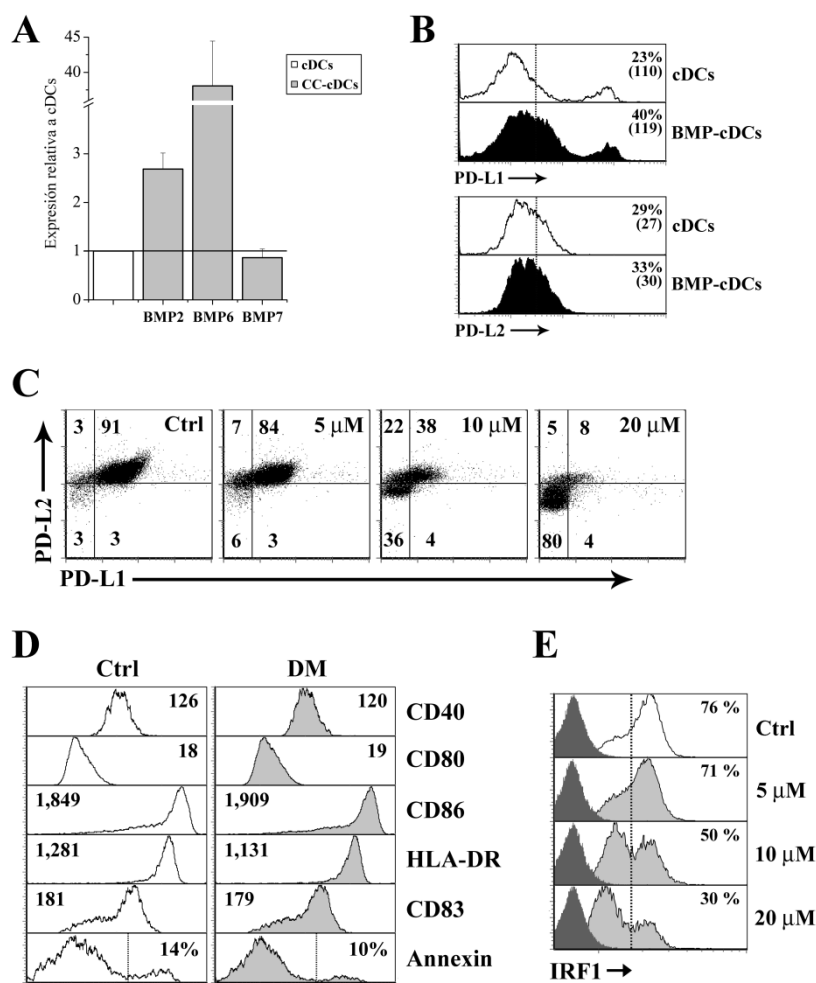


Figura 26. Regulación de la expresión de PD-L1 y PD-L2 por la vía canónica de señalización BMP en cDCs. cDCs aisladas de sangre periférica y cultivadas durante 36 horas en medio de cultivo solo (cDCs) o en presencia de un cóctel de citoquinas pro-inflamatorias (CC-cDCs) fueron empleadas para la determinación de la expresión de BMP2, BMP6 y BMP7 mediante PCR cuantitativa a tiempo real. GNB2L1 fue usado como control endógeno.

La gráfica muestra la media \pm desviación estándar de 2 experimentos independientes. Adicionalmente, la expresión de PD-L1 y PD-L2 (B), además de otros marcadores de maduración y del porcentaje de células apoptóticas (C), fueron determinados mediante citometría de flujo tras 36 horas de estimulación con el cóctel de citoquinas solo o suplementado con las dosis de DM indicadas. (D) De forma alternativa, las cDCs tratadas en las mismas condiciones fueron permeabilizadas para determinar los niveles de IRF1 intracelular mediante citometría de flujo. (E) El efecto de BMP-4 sobre la expresión de PD-L1 y PD-L2 en cDCs fue analizado por citometría de flujo tras 60-84 horas de cultivo en presencia o ausencia del ligando. Los porcentajes correspondientes a cada cuadrante y el porcentaje de células positivas e intensidad de fluorescencia media son indicados en los gráficos de puntos e histogramas respectivamente. Los resultados son representativos de 2-5 experimentos independientes.

7. LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN BMP SE INDUCE EN MoDCs EN RESPUESTA A DIFERENTES ESTÍMULOS MADURATIVOS

Varios trabajos han demostrado que la estimulación con $\text{TNF}\alpha$ en diferentes tipos celulares es capaz de activar la vía de señalización BMP a través de un incremento en la expresión de ligandos BMP^{180,181,190-192}. Dado que $\text{TNF}\alpha$ es uno de los componentes del cóctel pro-inflamatorio empleado en nuestro sistema de maduración de DCs, nos propusimos finalmente averiguar la contribución de esta citoquina a la producción de BMP-4 inducida durante la maduración de estas células. Para ello, se estimularon iDCs con $\text{TNF}\alpha$ solo y con el cóctel de citoquinas sin $\text{TNF}\alpha$ y la producción de BMP-4 se comparó con la obtenida al estimular con el cóctel pro-inflamatorio completo. Los resultados obtenidos por ELISA muestran que, tras 36 horas de cultivo, no se encontraron diferencias en los niveles de BMP-4 secretado al medio entre los tres tipos de estimulación empleados (Figura 27). A tenor de estos resultados, $\text{TNF}\alpha$ no sería el único factor presente en el cóctel de citoquinas capaz de inducir la producción de ligandos BMP en las MoDCs.

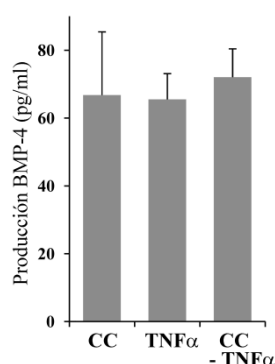


Figura 27. La producción de BMP-4 por mDCs no depende únicamente de $\text{TNF}\alpha$. iDCs fueron estimuladas con el cóctel de citoquinas completo (CC), con $\text{TNF}\alpha$ solo ($\text{TNF}\alpha$) o con el cóctel de citoquinas sin $\text{TNF}\alpha$. A las 36 horas de cultivo los sobrenadantes fueron empleados para la determinación por ELISA de los niveles de BMP-4 secretado al medio. Los resultados muestran la media \pm desviación estándar de 2 experimentos independientes.

Estos resultados nos hicieron plantearnos si la producción de ligandos BMP por parte de las MoDCs se daría no solo en respuesta a la estimulación con citoquinas pro-inflamatorias, sino más bien como un mecanismo intrínseco al proceso de maduración de estas células. Para probar esta hipótesis, se determinó la producción de BMP-4 a lo largo de 36 horas de estimulación con factores clásicamente empleados como estímulos madurativos en las DCs. La adición al medio de LPS, CD40-L o ambos combinados dio como resultado en los tres casos un incremento paulatino en los niveles de BMP-4 muy similar al observado cuando las MoDCs eran estimuladas con el cóctel pro-inflamatorio (Figura 28A).

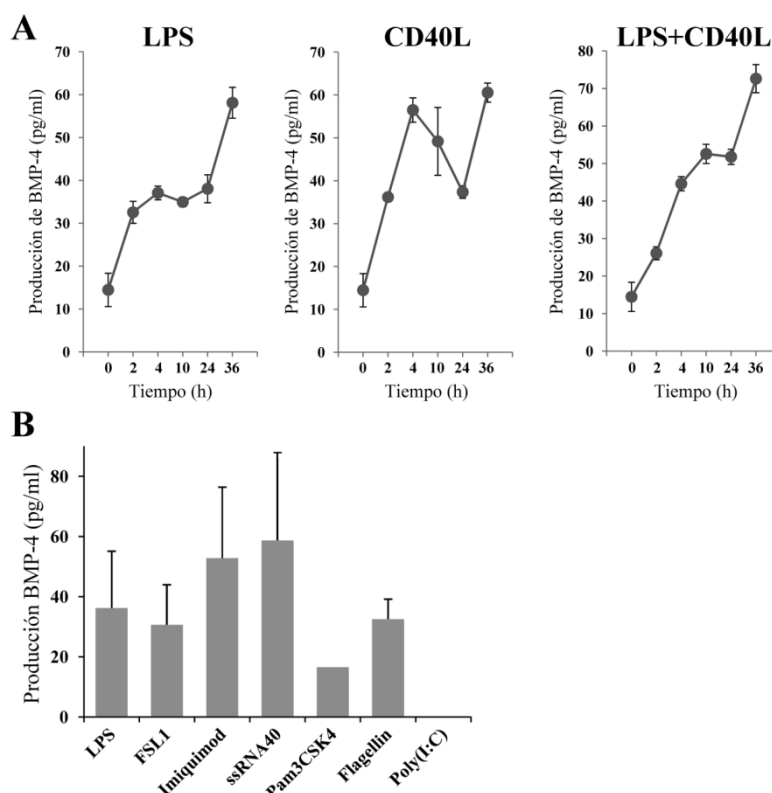


Figura 28. Producción de BMP-4 por las DCs en respuesta a diferentes estímulos. (A) iDCs fueron estimuladas con LPS, CD40L o LPS más CD40L y los sobrenadantes fueron recogidos en los tiempos indicados a lo largo de 36 horas. La secreción de BMP-4 al medio fue determinada por ELISA. Los resultados muestran la media \pm desviación estándar de los duplicados. (B) iDCs fueron estimuladas durante 36h con los agonistas de TLRs indicados en la gráfica y la secreción de BMP-4 al medio fue analizada mediante ELISA. Las barras representan la media \pm desviación estándar de al menos 2 experimentos independientes. En el caso de Pam3CSK4, la activación con este agonista fue realizada una sola vez.

Seguidamente, quisimos hacer el estudio extensible a la estimulación vía TLR empleando diferentes agonistas que señalizan a través de estos receptores: LPS (unión a TLR4), FSL1 (unión a TLR6/2), Imiquimod (unión a TLR7), ssRNA40 (unión a TLR8), Pam3CysSerLys4 (unión a TLR1/2), S. t. Flagellin (unión a TLR5) y Poly I:C (unión a TLR3). Como muestran los resultados, a pesar de la heterogeneidad observada entre donantes, todos los estímulos ensayados, a excepción de Poly I:C, indujeron en mayor o menor medida la producción de BMP-4 en las MoDCs (Figura 28B), lo que indicaría que la ruta BMP podría ser activada en estas condiciones. Los estímulos Poly I:C y LPS han sido descritos en DCs por su capacidad para inducir la expresión de PD-L1^{148,193} y fueron, por lo tanto, empleados para tratar de dilucidar si la activación de la vía de señalización BMP también regulaba la expresión de PD-L1 y PD-L2 inducida vía TLR. Como muestra la Figura 29, la expresión de PD-L1 se vio reducida a consecuencia de la

inhibición de la vía BMP durante la estimulación con los dos agonistas, mientras que PD-L2 resultó mínimamente afectado en ambos casos.

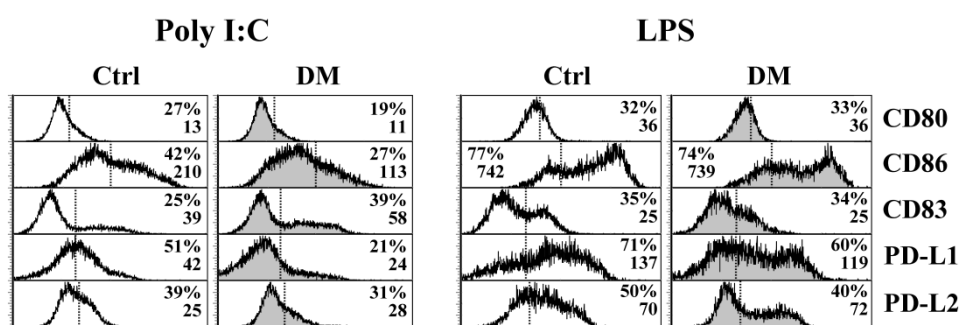


Figura 29. Efecto del bloqueo de la vía de señalización BMP durante la estimulación vía TLR. iDCs fueron estimuladas con los agonistas de TLR-3 y TLR-4, Poly I:C y LPS respectivamente, en presencia y en ausencia del inhibidor DM. Tras 36 horas de cultivo, la expresión de diferentes marcadores de maduración fue analizada en un citómetro de flujo. En cada histograma se muestran el porcentaje de células positivas y la intensidad de fluorescencia media. Los resultados son representativos de dos experimentos independientes.

8. LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN BMP EN LOS LINFOCITOS T CD4⁺ VÍRGENES

8.1 Los linfocitos T CD4⁺ vírgenes activados vía CD3/CD28 son capaces de responder a los ligandos BMP

Los resultados mostrados hasta ahora demuestran que la vía de señalización BMP estaría desempeñando una función relevante durante el proceso de maduración de las DCs, actuando como un factor autocrino/paracrino. Sin embargo, el aumento en la expresión de los ligandos de la familia BMP también podría llevar asociada una función paracrina sobre tipos celulares distintos. Dado que una de las principales funciones de las mDCs es la presentación antigénica a linfocitos T CD4⁺ vírgenes, nos planteamos si los ligandos BMP producidos por las mDCs podrían estar jugando un papel en esta interacción, comportándose en tal caso como factores paracrinos. Como primera aproximación a esta hipótesis se determinó si linfocitos T CD4⁺ vírgenes activados podrían ser capaces de responder a los ligandos BMP producidos por las mDCs. Para ello, linfocitos T CD4⁺ vírgenes de sangre periférica fueron aislados y activados vía TCR mediante la estimulación con anticuerpos monoclonales anti-CD3/anti-CD28. A los seis días de cultivo se estudió por RT-PCR cuantitativa en tiempo real la expresión de diferentes mediadores de la señalización BMP, encontrándose que los tres receptores de BMP tipo I y el pseudorreceptor BAMBI eran expresados en las células T activadas (Figura 30A). Asimismo, también pudo detectarse expresión de las tres proteínas BR-Smad y la Co-Smad (Figura 30A), por lo que todo indicaba que estas células tenían la capacidad para responder a las proteínas BMP. Para validar esta hipótesis, tras los 6 días de activación, se estimuló la vía de señalización BMP mediante la exposición de los linfocitos T activados a BMP-4 durante una hora y se analizó por RT-PCR cuantitativa en tiempo real la modulación de los genes *ID*. Como puede observarse en la Figura 30B, la expresión de *ID1* e *ID3* se vio aumentada de forma considerable en respuesta al ligando BMP-4, hasta cinco veces más en el caso de *ID3*, mientras que la expresión de *ID2* disminuyó a menos de la mitad respecto al control. Estos resultados prueban que efectivamente los linfocitos T activados son capaces de responder a la estimulación de la vía de señalización BMP.

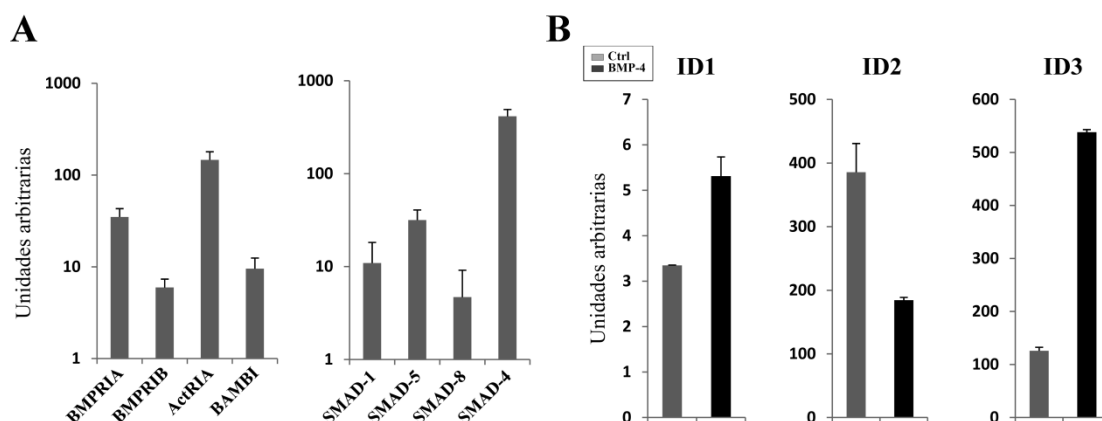


Figura 30. Los linfocitos T CD4⁺ activados expresan los componentes de la vía de señalización BMP y responden a la estimulación con ligandos. Linfocitos T CD4⁺ vírgenes humanos fueron aislados de sangre periférica y cultivados en medio completo con anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-CD28. A los 6 días de activación la expresión de diferentes componentes de la vía de señalización BMP fue analizada por RT-PCR cuantitativa a tiempo real. GAPDH fue empleado como gen endógeno. Los resultados representan la media \pm desviación estándar de al menos 3 experimentos independientes. (B) Tras 6 días de cultivo en presencia de anti-CD3/anti-CD28, los linfocitos T CD4⁺ fueron tratados durante 1 hora con BMP-4 (barras negras) o no tratados (barras grises). La expresión de ID1, ID2 e ID3 fue analizada por RT-PCR cuantitativa a tiempo real y los valores normalizados frente a la expresión de GAPDH. Los resultados son representativos de 2 experimentos independientes.

8.2 La expresión en membrana de BMPRIA se induce en los linfocitos T activados en respuesta a diferentes estímulos

El descubrimiento de que los linfocitos T adquieren la capacidad de responder a ligandos BMP tras su activación vía TCR nos llevó a estudiar cual sería el patrón de expresión los receptores de BMP en estas células a lo largo del proceso de activación. BMPRIA es uno de los receptores de BMP tipo I más extensamente expresados y además se ha demostrado que tiene una gran afinidad por los ligandos BMP del grupo BMP-2/4^{5,59,81,83,194}, de manera que decidimos centrarnos en el estudio de la expresión de este receptor. El análisis por citometría de flujo a lo largo de los seis días de cultivo mostró que en los linfocitos T CD4⁺ vírgenes la activación vía TCR producía un rápido incremento en la expresión de BMPRIA, siendo el 12% de las células positivas para el receptor a tan solo un día de cultivo. El porcentaje de células positivas para BMPRIA experimentó un ascenso paulatino a lo largo del cultivo con un pico del 25% de las células a los cinco días de activación (Figura 31A). Al estudiar la expresión de BMPRIA respecto al marcador de activación CD25 se observó que la presencia en membrana del receptor de BMPs aparecía asociada preferentemente a aquellas células

que respondían a la activación en términos de expresión de CD25. Más concretamente, en los 3 puntos estudiados el porcentaje de células BMPRIA⁺ fue muy superior en las células T CD25⁺ respecto a las CD25⁻, manteniéndose alrededor de un 40% de células BMPRIA⁺ en la población CD25⁺ entre el día 4 y el 6 de activación frente a un 15% y un 6%, respectivamente, en la población CD25⁻ (Figura 31B).

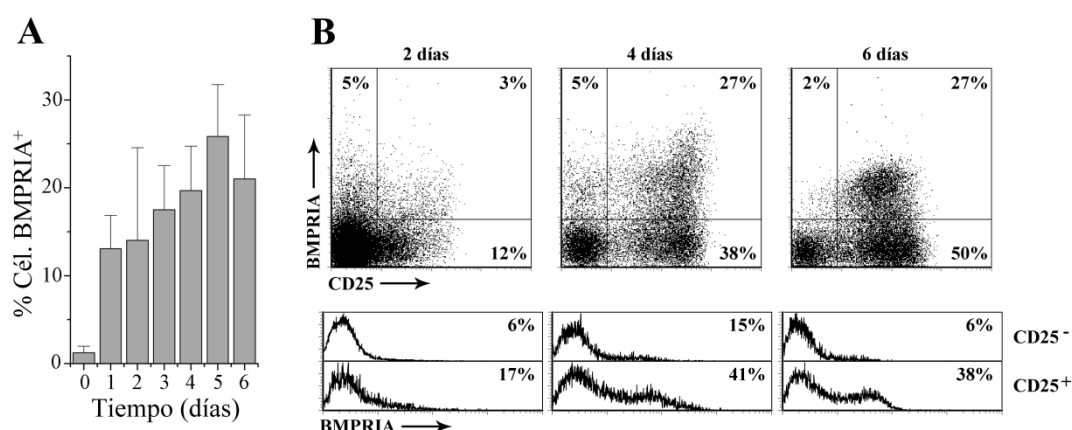


Figura 31. Expresión de BMPRIA durante la activación de linfocitos T CD4⁺ vírgenes. (A) Análisis por citometría de flujo de la expresión de BMPRIA en linfocitos T CD4⁺ vírgenes cultivados con anti-CD3/anti-CD28 a lo largo de 6 días. Las barras representan la media \pm desviación estándar del porcentaje de células BMPRIA⁺ de al menos 2 experimentos independientes. (B) Expresión de BMPRIA y CD25 en linfocitos T a los 2, 4 y 6 días de activación. Los diagramas de puntos (paneles superiores) muestran la representación biparamétrica de la expresión de BMPRIA y CD25. Los histogramas (paneles inferiores) representan el porcentaje de células BMPRIA⁺ en las poblaciones CD25⁻ y CD25⁺ de linfocitos T. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

Para estudiar si la expresión inducida de BMPRIA era dependiente únicamente de la estimulación simultánea con anti-CD3/anti-CD28 o si, por el contrario, se trataba de una característica intrínseca al proceso de activación, células mononucleares de sangre periférica fueron cultivadas en presencia de ConA o PMA más Ionomicina. Tras 36 horas de cultivo, se analizó por citometría de flujo la expresión de BMPRIA en los linfocitos T CD4⁺ activados. El análisis fenotípico mostró que, de las células activadas CD25⁺, un 38% en el caso de la estimulación con ConA y casi un 70% en el caso del PMA más ionomicina eran positivas también para BMPRIA (Figura 32).

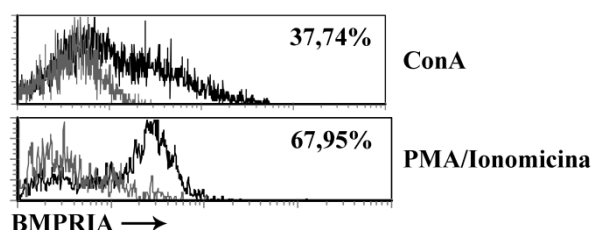


Figura 32. Expresión de BMPRIA en linfocitos T CD25⁺. (A) Células mononucleares de sangre periférica fueron cultivadas en presencia de ConA o PMA más Ionomicina (PMA/Ionomicina) durante 36 horas y la expresión de BMPRIA en células T CD4⁺ activadas fue analizada por citometría de flujo. Los linfocitos T activados fueron definidos como células CD3⁺CD4⁺CD25⁺. El porcentaje de células BMPRIA⁺ es mostrado en cada histograma.

A continuación analizamos si lo mismo podría ocurrir en el contexto de una situación patológica que conllevara la activación de linfocitos T. La enfermedad de injerto contra huésped (EICH) es un desorden que aparece con cierta frecuencia en alotransplantes de precursores hematopoyéticos de médula ósea y que en última instancia causa complicaciones a causa de la activación de las células inmunitarias transplantadas¹⁹⁵. Para averiguar si en linfocitos T activados en una situación patológica *in vivo* también se inducía la expresión de BMPRIA, muestras de sangre periférica de pacientes transplantados y que desarrollaron o no EICH fueron analizadas por citometría de flujo. Mientras que en los linfocitos T de aquellos pacientes que no desarrollaron EICH una vez alcanzado el estadio de quimera completa (hematopoyesis del donante) el porcentaje de células positivas para BMPRIA no superaba el 1% (Figura 33A), el porcentaje de células BMPRIA⁺ en el mismo estadio en aquellos individuos que posteriormente fueron diagnosticados de EICH fue superior al 10% (Figura 33B). En línea con nuestros resultados obtenidos *in vitro*, en el momento de diagnóstico de la EICH, y por lo tanto con presencia de células T activadas, dentro de la población de los linfocitos T más de la mitad de estas células eran BMPRIA⁺. Finalmente, el tratamiento de la enfermedad y posterior remisión dio como resultado una disminución prácticamente total del porcentaje de linfocitos T BMPRIA⁺ (Figura 33B).

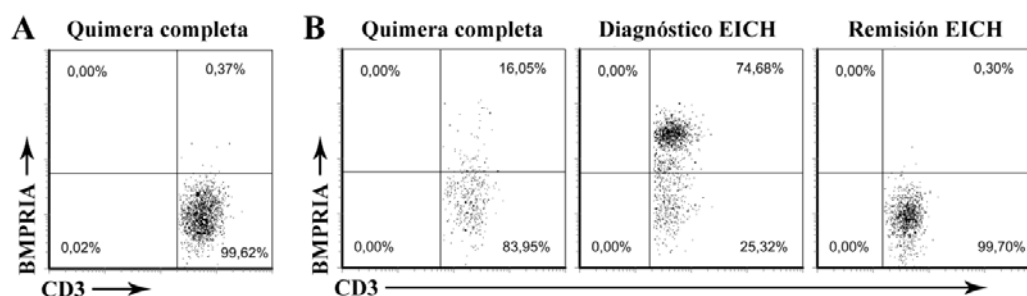


Figura 33. Expresión de BMPRIA en linfocitos T de pacientes transplantados que desarrollan EICH. Análisis por citometría de flujo de células mononucleares de sangre periférica de pacientes transplantados que no desarrollaron EICH (A) o que sí desarrollaron EICH (B). Las muestras fueron tomadas en el estadio de quimera completa, en el momento del diagnóstico del EICH y en la fase de remisión tras el tratamiento correspondiente. Los linfocitos T fueron definidos en base al tamaño/complejidad y la expresión de CD3. En los diagramas de puntos se muestra el porcentaje que corresponde a cada cuadrante.

8.3 Las células T $CD4^+$ $BMPRIA^+$ se generan de forma continuada a lo largo del proceso de activación

A tenor de los resultados anteriores, una de las preguntas que surgió fue si las células $BMPRIA^+$ que estábamos observando en los diferentes modelos estudiados podrían ser una subpoblación de células T que resultaba expandida en respuesta a la estimulación. Para responder a esta cuestión, linfocitos T $CD4^+$ vírgenes fueron activados vía TCR, y a los 4 días de cultivo se separaron las poblaciones $CD25^+BMPRIA^+$ y $CD25^+BMPRIA^-$ para su posterior re-estimulación con anticuerpos monoclonales anti-CD3/anti-CD28. Tras 36 horas de re-estimulación, el fenotipo de ambas poblaciones fue analizado por citometría de flujo. Los resultados obtenidos muestran que, del total de células $CD25^+BMPRIA^+$ puestas en cultivo, solo un 42% mantuvo la expresión en membrana de BMPRIA sin por ello perder la expresión de CD25 (Figura 34). Por otro lado, la re-estimulación de células $CD25^+BMPRIA^-$ dio como resultado la aparición de al menos un 12% de células $CD25^+BMPRIA^+$ a las 36 horas de estimulación (Figura 34). Estas observaciones son claros indicios de que la expresión en membrana de BMPRIA no solo no define una subpoblación de linfocitos T, sino que parece mostrar un comportamiento cíclico en el que las células adquieren y pierden la expresión del receptor a lo largo del proceso de estimulación.

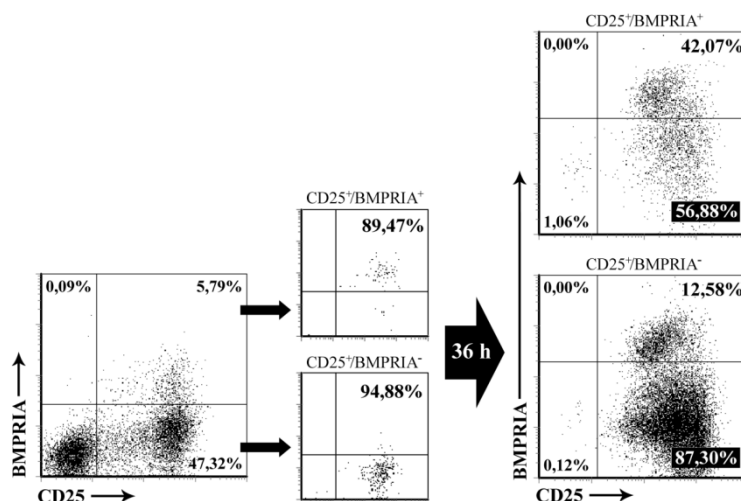


Figura 34. Expresión dinámica de BMPRIA durante la activación de células T CD4⁺. Linfocitos T CD4⁺ vírgenes fueron cultivados en presencia de anti-CD3/anti-CD28 y tras 4 días de activación fueron separados por sorting en función de la expresión de CD25 y BMPRIA. Las células CD25⁺BMPRIA⁺ y CD25⁺BMPRIA⁻ fueron re-estimuladas en medio fresco con anti-CD3/anti-CD28 durante 36 horas y la expresión de CD25 y BMPRIA fue analizada por citometría de flujo. Los porcentajes correspondientes a cada cuadrante son mostrados en cada diagrama de puntos.

8.4 La estimulación de la vía de señalización BMP regula positivamente la activación de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes inducida a través de TCR

El objetivo de este apartado de los resultados era determinar si el aporte de ligandos BMP secretados por las mDCs podría tener algún efecto sobre la activación de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes. Para ello, el modelo de activación con anticuerpos monoclonales anti-CD3/anti-CD28 nos brindaba la posibilidad de evaluar los efectos que un aporte exógeno de proteínas BMP tendría sobre la activación de los linfocitos T, mimetizando de esta forma un hipotético encuentro con las mDCs. Para simplificar el modelo experimental, se escogieron los ligandos BMP-2 y BMP-4 por formar un solo grupo dentro de la familia de proteínas BMPs que previamente ya había sido implicado en la diferenciación y activación de los linfocitos T^{75,80,81,85,196}. No obstante, ensayos realizados empleando los ligandos BMP-6 y BMP-7 mostraron efectos muy similares a los que se comentan a continuación (datos no mostrados). Inicialmente se estudió el posible papel de la vía de señalización BMP sobre la respuesta proliferativa de los linfocitos T. Linfocitos T CD4⁺ vírgenes fueron cultivados en presencia de anticuerpos monoclonales anti-CD3/anti-CD28 y, en los casos indicados, BMP-2 o BMP-4 fue adicionado al medio de cultivo. Como consecuencia de la estimulación con cualquiera de los dos ligandos, la respuesta proliferativa de los linfocitos T, medida por

incorporación de BrdU al ADN de nueva síntesis, se vio aumentada a los 4 días de cultivo de forma significativa respecto al control, siendo un 70% y un 30% mayor en las células tratadas con BMP-2 y BMP-4 respectivamente (Figura 35A). El análisis de la expresión de CD25 mostró un fuerte incremento en la expresión de esta molécula por las células activadas en presencia de ligandos BMP, acompañado de un aumento también notable en el porcentaje de células positivas (Figura 35B). Por último, y en línea con lo anterior, los niveles de las citoquinas $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ e IL-2 secretadas por los linfocitos T se vieron aumentados como resultado de la adición de BMP-2 o BMP-4 a los cultivos (Figura 35C). Concretamente, BMP-2 aumentó hasta tres veces la producción de $\text{TNF}\alpha$ y un 50% la de $\text{IFN}\gamma$. De forma similar, BMP-4 incrementó los niveles de $\text{TNF}\alpha$ aproximadamente al doble respecto al control y dio lugar a una subida de hasta 4 veces en la secreción de $\text{IFN}\gamma$. Finalmente, la producción de IL-2 se vio incrementada de manera muy similar por ambos ligandos, siendo los niveles observados en los dos tratamientos más del doble respecto a los cultivos control (Figura 35C).

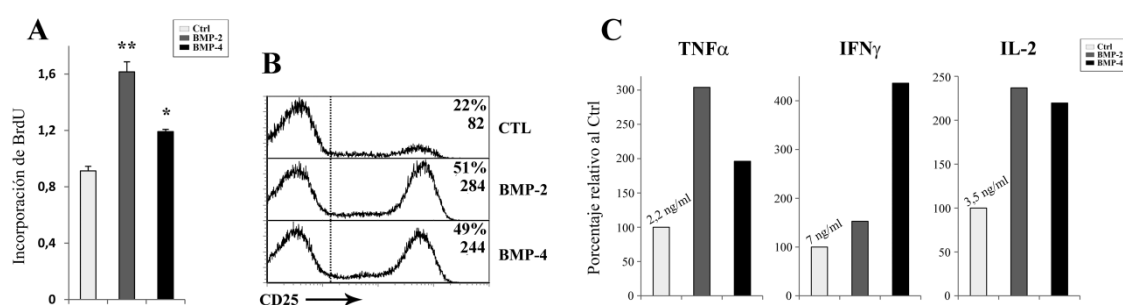


Figura 35. La estimulación de la vía de señalización BMP incrementa la activación de los linfocitos T vía TCR. Linfocitos T CD4^+ vírgenes fueron estimulados mediante el cultivo con anti-CD3/anti-CD28 solo (Ctrl) o suplementado con BMP-2 o BMP-4. A los 4 días se determinó la respuesta proliferativa por incorporación de BrdU al ADN de nueva síntesis (A). Adicionalmente se analizó la expresión de CD25 por citometría de flujo (B) y la secreción al medio de $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ e IL-2 por ELISA (C). Los resultados son representativos de 5 experimentos independientes. Las gráficas representan la producción de citoquinas relativa al control ($y=100$). Los valores del tratamiento control para la concentración de cada citoquina son indicados.

9. PAPEL DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN BMP EN LA INTERACCIÓN ENTRE mDCs Y LINFOCITOS T CD4⁺ VÍRGENES

9.1 El contacto con mDCs induce la expresión de BMPRIA y la fosforilación de Smad-1/5/8 en los linfocitos T CD4⁺ vírgenes

Una vez establecido que los linfocitos T CD4⁺ vírgenes expresaban los componentes de la vía de señalización BMP tras la estimulación vía TCR, el siguiente paso fue estudiar si el contacto con DCs producía el mismo efecto. De esta forma, linfocitos T CD4⁺ vírgenes fueron cultivados solos o con mDCs alogénicas y la expresión de BMPRIA fue analizada por citometría de flujo a lo largo de 6 días de co-cultivo. Los resultados muestran un aumento paulatino en el porcentaje de células T positivas para BMPRIA alcanzando aproximadamente un 25% a los 6 días de co-cultivo (Figura 36A). Por el contrario, el cultivo de linfocitos T solos, es decir, en ausencia de mDCs, no indujo la expresión de BMPRIA en estas células, indicando que el contacto linfocito T-mDC sería necesario para la inducción de la expresión de BMPRIA en las células T.

A continuación se estudió si la expresión de BMPRIA estaba asociada a las células que proliferaban y que, por lo tanto, respondían a la estimulación por parte de las mDCs. Para este estudio, linfocitos T CD4⁺ vírgenes fueron teñidos con CFSE previamente al co-cultivo con mDCs y la proliferación de las células T fue determinada por pérdida de intensidad de CFSE. Los resultados obtenidos tras el análisis comparativo entre células CFSE^{low} (proliferantes) y CFSE^{high} (no proliferantes) mostraron que, al igual que los marcadores de activación CD69 y CD25, la expresión de BMPRIA y la forma activa de las proteínas BR-Smad, Smad-1/5/8, se encontraban prácticamente solo en aquellas células que se habían dividido (Figura 36B). En concreto, el porcentaje de células BMPRIA⁺, al igual que el de células con presencia de la forma fosforilada, es decir, activa de Smad-1/5/8, fue de aproximadamente el 40% en la población de células CFSE^{low}, mientras que no pasó del 5% en las células CFSE^{high}. Por lo tanto, estos resultados indicarían que aquellos linfocitos que responden al contacto con mDCs proliferando, no solo expresan BMPRIA sino que también activan la vía canónica de señalización BMP.

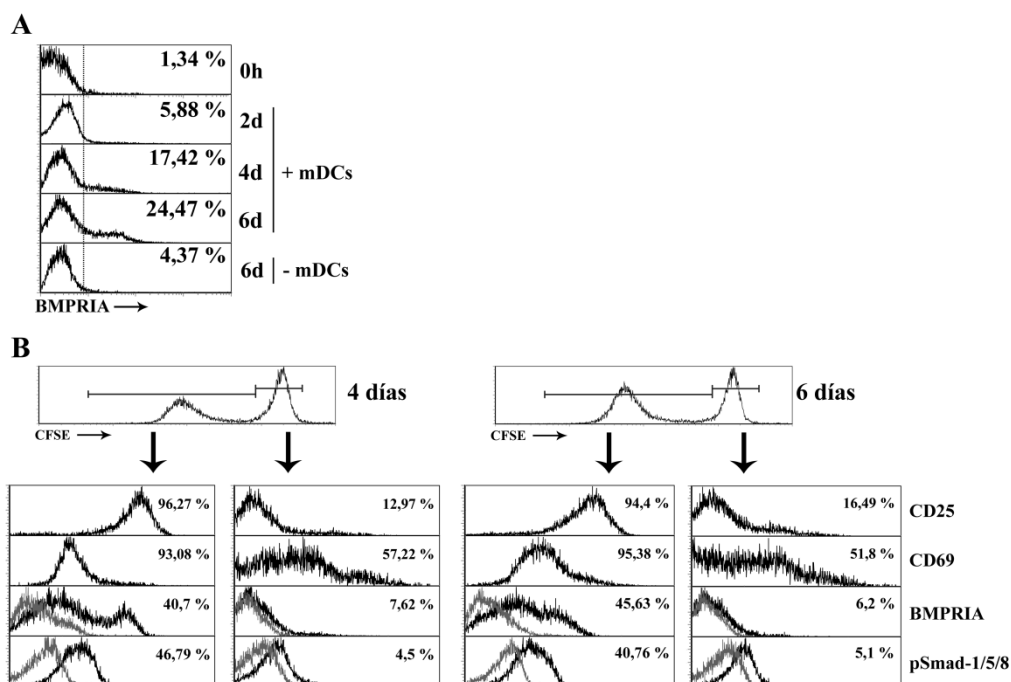


Figura 36. Expresión de BMPRIA en linfocitos T cultivados con mDCs. (A) Análisis por citometría de flujo de la expresión de BMPRIA en linfocitos T CD4⁺ vírgenes antes y después de ser cultivados solos o con mDCs en los tiempos indicados a lo largo de 6 días. Las células T fueron definidas en base al tamaño/complejidad y la expresión de CD3. (B) Linfocitos T CD4⁺ vírgenes fueron teñidos con CFSE previamente al co-cultivo con mDCs. A los 4 y 6 días se analizó por citometría de flujo la expresión de CD25, CD69, BMPRIA y los niveles de Smad-1/5/8 fosforiladas en función de la respuesta proliferativa de los linfocitos T. Las células proliferantes fueron definidas como CFSE^{low} y las no proliferantes como CFSE^{high}. En el caso de Smad-1/5/8 fosforiladas, como control negativo se realizó la tinción con los anticuerpos pre-adsorbidos con el péptido bloqueante (perfiles grises). El porcentaje de células positivas es indicado en cada histograma.

9.2 Las células T activadas por contacto con mDCs que expresan BMPRIA tienen una tasa proliferativa mayor, principalmente en los primeros estadios de la activación

Son varios los autores han demostrado que las proteínas BMP pueden regular positivamente la proliferación de diferentes tipos celulares. La estrecha asociación observada entre la expresión de BMPRIA, y la activación de Smad-1/5/8, con la respuesta proliferativa de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes durante la comunicación con mDCs, nos llevó a tratar de estudiar en mayor profundidad esta relación en nuestro modelo experimental. Para estos experimentos se empleó la tinción de ADN con el colorante Hoechst para la determinación del porcentaje de células que estaban ciclando en un momento dado. La combinación de la tinción con Hoechst y el marcaje para CD25 y BMPRIA nos permitió determinar el fenotipo de las células en ciclo a 2, 4 y 6

días en los co-cultivos linfocito T-mDC. Como muestra la Figura 37A, los linfocitos T que expresaban BMPRIA, y que presumiblemente estarían respondiendo a los ligandos BMP secretados por las mDCs, mantuvieron un mayor porcentaje de células en ciclo a lo largo de los 6 días de cultivo en comparación con aquellas que no expresaban el receptor. Los linfocitos T BMPRIA⁺ ciclaban hasta 30 veces más que los BMPRIA⁻ a los 2 días del co-cultivo, mientras que esta ventaja proliferativa pasaba a ser del doble a los 4 días y de aproximadamente un 50% a los 6 días.

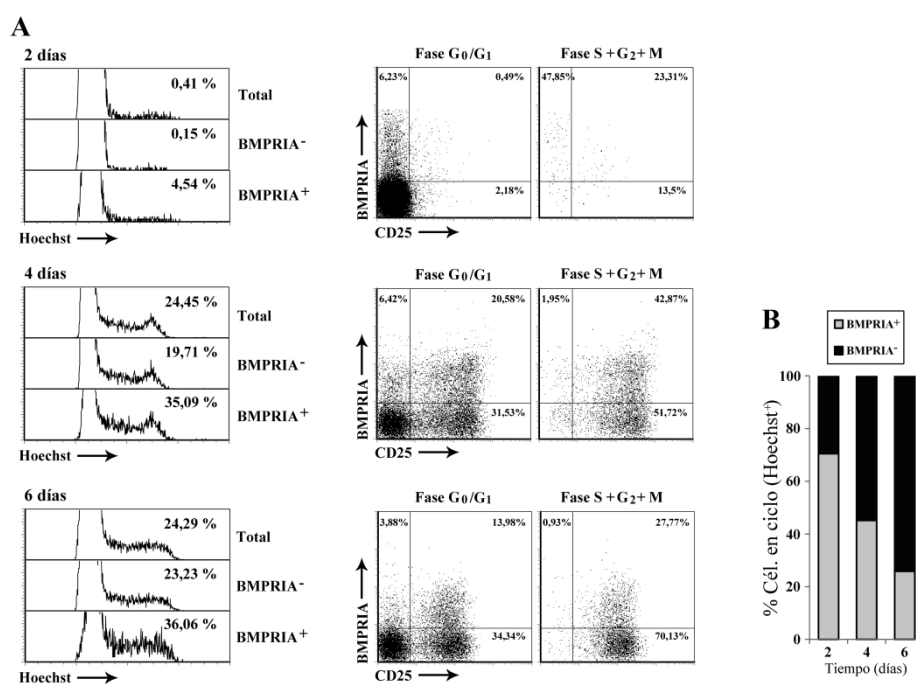


Figura 37. Determinación de la expresión de BMPRIA y del estado del ciclo celular en linfocitos T cultivados con mDCs. El porcentaje de linfocitos T CD4⁺ que ciclan tras el co-cultivo con mDCs fue determinado mediante la tinción del ADN con el colorante Hoechst. En los histogramas se muestra el porcentaje de células en ciclo en la población de linfocitos T totales y en las subpoblaciones BMPRIA⁻ y BMPRIA⁺. Los diagramas de puntos de la derecha muestran la expresión de CD25 y BMPRIA en las células T en función de las fases del ciclo celular en las que se encontraban a los tiempos indicados. (B) Porcentaje de células T BMPRIA⁻ y BMPRIA⁺ respecto al total de células T en ciclo a los 2, 4 y 6 días de co-cultivo con mDCs.

Al comparar el fenotipo de las células en ciclo (fases S, G₂ y M del ciclo celular) con el de aquellas que no estaban ciclando (fases G₀ y G₁) se pudo observar que, en el estadio más temprano de la activación de los linfocitos T, las células en ciclo eran principalmente células CD25⁻BMPRIA⁺ (Figura 37A, paneles derechos). Estas proporciones cambiaron drásticamente a los 4 días, cuando prácticamente ninguna de las células en ciclo eran CD25⁻, sino que su fenotipo era CD25⁺BMPRIA⁺ y

CD25⁺BMPRIA⁻ en porcentajes muy similares. A los 6 días de cultivo, en el estadio terminal de la activación de los linfocitos T, el fenotipo de las células en ciclo celular era mayoritariamente CD25⁺BMPRIA⁻ (70,13%). La progresión del co-cultivo en términos de fenotipo de las células en ciclo se resume en la Figura 37B, donde puede observarse cómo en el momento más temprano de la activación el peso de la proliferación total recaía principalmente sobre las células que expresaban BMPRIA, pasando de forma gradual a lo largo del proceso de activación a aquellas células que no expresaban BMPRIA pero sí CD25. Aunque con números más modestos, esto mismo fue observado en linfocitos T CD4⁺ de bazo y ganglio linfático humanos (datos no mostrados), donde a pesar de los bajos porcentajes de células en ciclo (0,71% y 0,43% respectivamente), las células BMPRIA⁺ ciclaban 3 veces más en el caso del bazo y 5 veces más en el del ganglio linfático en relación a las BMPRIA⁻.

9.3 El bloqueo de la vía canónica de señalización BMP durante la interacción linfocito T CD4⁺ virgen-mDC afecta a la proliferación y activación de los linfocitos T

En conjunto, los resultados anteriormente comentados apuntan a que la expresión de BMPRIA, y la presumible respuesta a una fuente exógena de ligandos BMP (mDCs en nuestro modelo experimental), tienen un efecto positivo sobre la proliferación de los linfocitos T durante su activación y un papel dominante en los primeros estadios de tan complejo proceso. Para confirmar estas hipótesis, nos propusimos evaluar los posibles efectos del bloqueo de la vía de la señalización BMP durante la interacción linfocito T CD4⁺ virgen-mDC. Para ello se empleó el compuesto inhibidor DMH1, recientemente desarrollado y que ha mostrado una mayor eficiencia en la inhibición de la ruta canónica de señalización BMP que su homólogo, la DM⁷⁰. El primer acercamiento fue añadir a los co-cultivos linfocito T-mDC concentraciones crecientes de DMH1 y determinar el porcentaje de células en ciclo a los 2, 4 y 6 días de activación. La Figura 38A muestra cómo, en los primeros estadios de activación, es decir, a tan solo 2 días de cultivo, el bloqueo de la vía canónica de señalización BMP disminuyó el ya de por sí bajo porcentaje de células en ciclo (0,33% en el control frente a un 0,18% en las dos dosis de DMH1 ensayadas). Los efectos de la adición de DMH1 al co-cultivo se hicieron más drásticos a los 4 días, cuando ambas dosis redujeron en

más de cuatro veces el porcentaje de células que ciclaban. Finalmente, este tratamiento mantuvo a los 6 días de co-cultivo un efecto negativo y dosis-dependiente sobre el porcentaje de células en ciclo, aunque de menor magnitud que a los 4 días.

Para estudiar cuál había sido el efecto acumulativo del inhibidor DMH1 sobre la proliferación inducida en las células T durante el contacto con mDCs, los linfocitos T CD4⁺ vírgenes fueron teñidos con CFSE previamente al co-cultivo con las mDCs y el número de divisiones celulares fue determinado en base a la pérdida de intensidad del colorante. Aunque no fue posible observar pérdida de intensidad de CFSE a los 2 días de co-cultivo, sí pudo detectarse un fuerte descenso en el porcentaje total de células que se habían dividido a los 4 días a consecuencia del tratamiento con DMH1 (Figura 38B, paneles superiores). Esta disminución fue de casi un 70% con la dosis mayor de DMH1 a los 4 días, mientras que dos días después la bajada era de alrededor de un 30%, de nuevo con la concentración más alta de DMH1. Al analizar el número de divisiones que habían realizado las células CFSE^{low}, se halló que el tratamiento con DMH1 no sólo redujo el porcentaje total de células que se habían dividido sino que también el número de divisiones que éstas habían experimentado (Figura 38B, gráficas en la parte inferior). En particular, a los 4 días de activación, la mayoría de células T que habían proliferado en respuesta al contacto con las mDCs habían experimentado entre 4 y 5 divisiones en la condición control, mientras que el número de ciclos experimentado por estas células se redujo a tan solo 1-3 en los co-cultivos llevados a cabo en presencia de DMH1. De nuevo, y aunque con menor magnitud, el mismo efecto pudo ser advertido a los 6 días puesto que la mayor proporción de células proliferantes había experimentado un total de 6 divisiones en el control y alrededor de 5 en los tratamientos con DMH1.

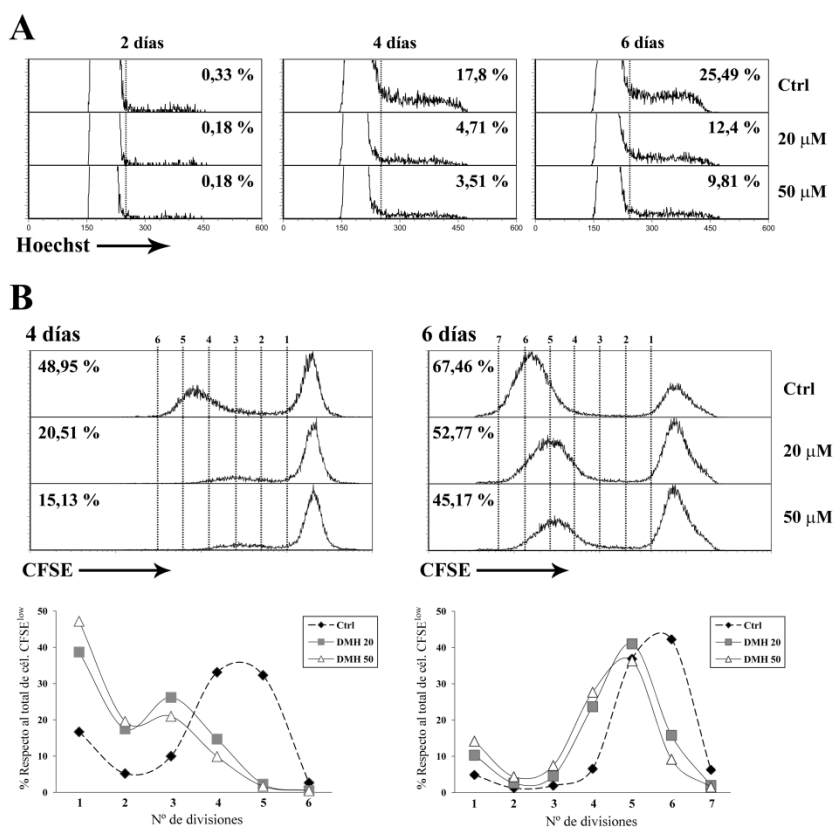


Figura 38. Efecto del bloqueo de la vía canónica de señalización BMP sobre la proliferación de los linfocitos T inducida por la interacción con mDCs. (A) Linfocitos T CD4⁺ vírgenes fueron cultivados con mDCs solo (Ctrl) o en presencia de las cantidades indicadas de DMH1. El porcentaje de células en división fue determinado por citometría de flujo a los 2, 4 y 6 días de co-cultivo mediante la tinción del ADN con el colorante Hoechst. (B) Linfocitos T CD4⁺ vírgenes fueron teñidos con CFSE previamente al co-cultivo con mDCs y el efecto del tratamiento con DMH1 a las dosis indicadas sobre el porcentaje de células que se habían dividido a lo largo de 4 y 6 días fue analizado por pérdida de intensidad de CFSE en un citómetro de flujo. Las gráficas de la parte inferior representan el porcentaje de células que se han dividido un número determinado de veces respecto al total de células que han proliferado (CFSE^{low}). Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

Al estudiar el fenotipo de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes durante la activación, se observó que los resultados obtenidos estaban en consonancia con los efectos del bloqueo de la señalización BMP sobre la proliferación de las células T. La presencia de DMH1 durante la activación de los linfocitos T dio lugar a un drástico descenso del porcentaje de células que habían proliferado y que expresaban los marcadores de activación CD69 y CD25 (Figura 39A y B). Concretamente, esta disminución fue de hasta cuatro veces para ambos marcadores a los 4 días (Figura 39A), considerando la dosis más alta de DMH1, y más modesta, aproximadamente de la mitad, a los 6 días en comparación con sus correspondientes controles (Figura 39B). Dado que el incremento en la expresión de las moléculas CD69 y CD25 en membrana se encontraba

estrechamente ligada a la respuesta proliferativa, no podemos descartar que la disminución del porcentaje de células positivas para estas moléculas fuese debido al efecto negativo de la DMH1 sobre la proliferación.

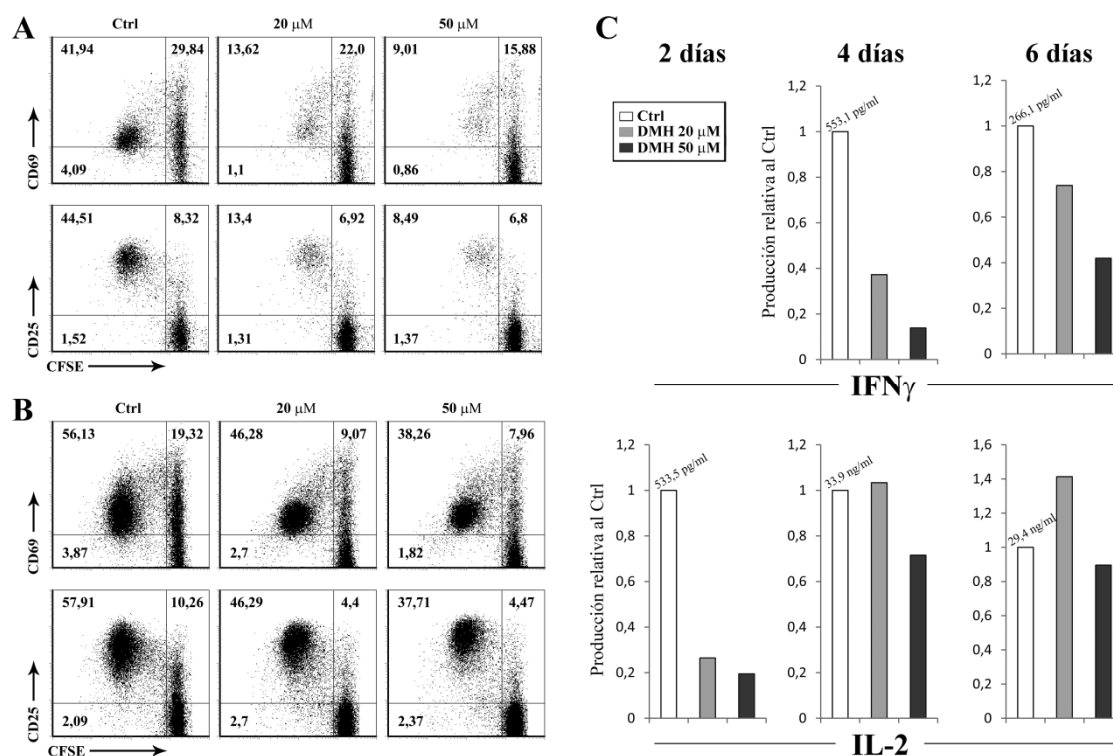


Figura 39. Efecto del bloqueo de la vía canónica de señalización BMP sobre el fenotipo y la producción de citoquinas inducidos en linfocitos T por contacto con las mDCs. Linfocitos T CD4⁺ vírgenes fueron teñidos con CFSE previamente al co-cultivo con mDCs en medio completo solo o suplementado con las dosis indicadas de DMH1. A los 4 (A) y 6 (B) días de co-cultivo la expresión de CD25 y CD69 fue analizada por citometría de flujo. En cada diagrama de puntos se muestran los porcentajes correspondientes a cada cuadrante. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. (C) Los sobrenadantes de los co-cultivos control y tratados con DMH1 fueron recogidos a 2, 4 y 6 días y ensayados para la producción de IFN γ e IL-2. A los 2 días de co-cultivo no fue posible detectar IFN γ en el medio. Las gráficas representan la producción de citoquinas relativa al control ($\gamma=1$). Los valores del tratamiento control para la concentración de cada citoquina son indicados.

Por último, los sobrenadantes de los co-cultivos control y tratados fueron recogidos y ensayados para la determinación de los niveles de IFN γ e IL-2. Aunque no pudo detectarse IFN γ a los 2 días de cultivo, sí se pudo observar a 4 y 6 días que la producción de esta citoquina se encontraba fuertemente afectada por el bloqueo de la vía canónica BMP, alcanzándose más de un 80% de disminución en los niveles de IFN γ a los 4 días y aproximadamente un 60% a los 6 días (Figura 39C, gráficas en parte superior). En cuanto a la producción de IL-2, la adición de DMH1 a los co-cultivos

redujo de forma dramática los niveles de IL-2 secretados a los 2 días de cultivo (alrededor de un 80% con las dos dosis de DMH1 ensayadas) (Figura 39C, gráficas en parte inferior). Al igual que con la proliferación, los efectos negativos del bloqueo de la vía canónica de señalización BMP sobre la secreción de IL-2 perdieron intensidad a lo largo del tiempo, llegando incluso a invertirse ligeramente a los 6 días.

DISCUSIÓN

Cada vez son más los trabajos que aportan evidencias sobre cómo factores clave en los procesos de embriogénesis y organogénesis en vertebrados, factores como los componentes de la familia de BMPs, participan también en la diferenciación celular y homeostasis de tejidos adultos como el sistema inmunológico y hematopoyético. En esta línea, aunque algunos trabajos evidencian posibles funciones de las proteínas BMP en las DCs humanas, bien es cierto que este campo no ha sido estudiado en profundidad hasta la fecha. El objetivo de este trabajo ha sido, por tanto, estudiar el papel de la vía de señalización BMP en diferentes aspectos de la biología de las DCs humanas y en su interacción con los linfocitos T CD4⁺.

Según los resultados obtenidos en este trabajo, las MoDCs expresan los componentes necesarios para la transducción de la vía de señalización BMP. Anteriormente dos trabajos mostraron, por un lado la expresión de ActRIA/ALK-2 en células pDCs y cDCs de sangre periférica humana¹⁹⁷ y por otro lado, la expresión de los tres receptores para BMP tipo I y el tipo II en DCs de ganglio linfático de ratón¹⁰⁵. Adicionalmente, nosotros demostramos en ambos estados de las MoDCs, iDCs y mDCs, la expresión de las proteínas BR-Smad y de la Co-Smad, así como la capacidad para fosforilar las BR-Smads en respuesta a la estimulación con ligandos BMP.

En cuanto a su capacidad de responder a ligandos BMP, la estimulación de las MoDCs con BMP-4 indujo la expresión de los genes *ID*, aunque dicha respuesta fue producida por rutas distintas entre la condición madura e inmadura. Los genes *ID* son genes diana primarios de la vía de señalización BMP, tanto por la vía canónica de las proteínas Smad, como por las vías no canónicas^{6,20}. En iDCs, la inducción dependiente de BMP-4 de la expresión de los miembros de la familia ID se produce de forma exclusiva a través de la vía BMP canónica. Sin embargo, en el caso de las mDCs el bloqueo de la fosforilación de las proteínas BR-Smad mediante la adición de DM inhibe la inducción de *ID1* e *ID3* pero no de *ID2*. El bloqueo en la inducción de *ID2* en mDCs por el tratamiento con el inhibidor de la p38 MAPK demuestra que también rutas independientes de las proteínas Smad participan en la señalización BMP en las mDCs. Este hecho no es un fenómeno exclusivo de las DCs, pues la convivencia de ambos tipos de vías de señalización iniciados por BMP en un mismo tipo celular ha sido descrito en diferentes sistemas^{83,198,199}.

Dado que la señalización BMP se inicia a través de receptores heterotetraméricos de distinta composición, diferencias en la afinidad y especificidad de cada interacción ligando-receptor puede dar lugar a señales con diferentes propiedades que a su vez permiten respuestas celulares cualitativa y cuantitativamente diferentes²⁰⁰. Una posible explicación a las diferencias en la respuesta que la estimulación de la vía BMP desencadena en iDCs y mDCs podríamos encontrarla en el estudio comparativo de la expresión en membrana de los receptores de BMPs en estas dos situaciones. Así, nuestros resultados muestran un cambio en el perfil de receptores expresados en membrana tras la maduración de las DCs. Concretamente, el proceso de maduración da lugar a un descenso en la expresión de BMPRIA y del pseudorreceptor BAMBI, mientras que no afecta a la de BMPRIB. De forma contraria, las mDCs aumentan la expresión en membrana de ActRIA y BMPRII respecto a las iDCs. La batería de receptores para BMPs que una célula expresa en su membrana no sólo puede modificar la afinidad por los diferentes ligandos, también puede condicionar la ruta de transducción de la señal y el tipo de respuesta que se origina^{33,34}. Es más, la presencia o no en la membrana de complejos receptores tipo I/tipo II preformados parece ser determinante para que la señalización BMP se produzca o bien a través de las proteínas BR-Smad o bien por vías alternativas. Adicionalmente, diferentes mecanismos regulan la presencia en la membrana de cada una de las posibles combinaciones entre los receptores de BMP^{37,201-203} (revisado en²⁰⁴). Según está descrito, la unión de BMP a un complejo receptor heterotetramérico preformado induce la fosforilación de los mediadores BR-Smad, siendo su internalización dependiente de clatrina la que permite que esta señal se traduzca en la inducción de genes diana. De forma alternativa, la unión del ligando es capaz de inducir la formación del complejo receptor iniciando la transducción de su señal a través de rutas alternativas, principalmente p38 MAPK, y de forma dependiente de la internalización del complejo vía caveolas^{35,36} (revisado en¹¹). Ambos mecanismos, presencia o no de complejos receptores preformados y diferencias en afinidad y especificidad de los diferentes tipos de receptores, podrían ser la explicación a las variaciones observadas entre iDCs y mDCs para la transducción de la señal inducida por la unión del ligando BMP a su receptor específico.

Un número considerable de trabajos han señalado ya el papel de la familia de proteínas BMP sobre la diferenciación de células del sistema inmunitario. Sin embargo, la mayoría de trabajos han centrado su atención en la linfopoyesis a partir precursores

intratímicos y de médula ósea^{75-80,90,91} y nada ha sido publicado en relación al papel de las proteínas BMP en la diferenciación de las DCs. Por este motivo, nuestro primer acercamiento fue estudiar el posible efecto de la estimulación de la vía de señalización BMP durante la diferenciación de las DCs a partir de monocitos.

A pesar de que los componentes de la vía de señalización BMP se expresan en MoDCs y en sus precursores los monocitos, la estimulación de esta vía durante la diferenciación de las DCs no modifica dicho proceso ni en términos de fenotipo ni de funcionalidad. Varios trabajos han mostrado la expresión de receptores de BMP en monocitos y líneas celulares monocíticas, en los cuales estos ligandos regulan procesos de quimiotaxis, proliferación y diferenciación celular^{33,92-94}. En este último caso, parece que BMP-7 promueve la diferenciación de la línea celular monocítica THP-1 a macrófagos tipo M2⁹⁴. Y en cuanto a su potencial para diferenciar a osteoclastos, según el ligando estudiado los efectos pueden ser contrarios puesto que BMP-9 parece promover esta diferenciación a través de las proteínas BR-Smad y Erk/MEK mientras que BMP-7 la inhibiría en presencia de RANKL y/o IL-8^{95,96}. Por otro lado, resultados no publicados obtenidos en nuestro laboratorio indican que los monocitos podrían ser una fuente productora de proteínas BMP tras la exposición a ciertos estímulos. Por lo tanto, la activación exógena de la vía de señalización BMP no tendría un efecto sobre la diferenciación de los monocitos hacia DCs, aunque esta falta de efecto no puede atribuirse a la incapacidad de los monocitos para responder a los ligandos BMP.

Para estudiar las posibles funciones de las proteínas BMP en las DCs, se evaluó inicialmente el impacto de la estimulación con BMP-4 sobre la supervivencia de estas células, observándose un incremento únicamente en el caso de las iDCs. Ambos tipos de señalización BMP, canónica y no canónica, han sido descritos de forma repetida por su capacidad para regular la proliferación, supervivencia y diferenciación celular, siendo el carácter de esta regulación altamente dependiente del tipo celular estudiado^{80,83,91,205-210}. Así, y en relación con la viabilidad celular, ratones que no expresan BMPRII muestran un aumento en la apoptosis de células bipolares y progenitores durante el desarrollo postnatal de la retina²¹¹, al igual que la transducción de la señal BMP a través de los receptores tipo I aumenta la supervivencia en líneas celulares de cáncer de pulmón a través de un incremento en la expresión de proteínas de la familia ID²⁰⁸. Adicionalmente, se ha demostrado que BMP-4 estimula la supervivencia de las células

stem mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo²¹². Centrando la atención en el sistema inmunitario, nuestro grupo ha descrito que el bloqueo de la señalización BMP endógena mediante el tratamiento con Noggin incrementa la apoptosis de los precursores intratímicos CD34⁺ humanos⁸⁰ y que la producción de BMPs inducida por IL-15 durante la diferenciación de estos precursores hacia células NK regula positivamente la supervivencia y diferenciación de estas células⁹¹. Los resultados presentados en nuestro estudio están en total concordancia con estos trabajos puesto que demuestran que la presencia de BMP-4 en el medio disminuye de forma considerable la apoptosis inducida por ausencia de factores de crecimiento en las iDCs pero no en las mDCs. Los mecanismos que regulan la señalización BMP propuestos por el grupo de la Dra. Petra Knaus³⁵, y otros mecanismos alternativos anteriormente citados, podrían ser la explicación a que a pesar de que ambas subpoblaciones de DCs, inmaduras y maduras, expresan los componentes de la vía de señalización BMP, solo en iDCs la estimulación de esta vía regula de forma positiva la supervivencia.

Como mecanismo mediador del efecto positivo de la vía BMP sobre la supervivencia de las iDCs, nuestros resultados muestran que el tratamiento con BMP-4 indujo un aumento en la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2. Dado que la proteína pro-apoptótica Bax no se vio alterada, la estimulación con BMP-4 dio como resultado un incremento en el ratio Bcl-2/Bax que podría ser la causa del mantenimiento de la viabilidad de las iDCs. La regulación de la supervivencia a cargo de la vía de señalización BMP es mediada en muchos casos por la regulación de los niveles de las proteínas Bcl-2 y Bcl-X_L^{32,198,213}. Asimismo, la familia de proteínas Bcl-2 ha sido ampliamente descrita por su papel en la regulación de la supervivencia de las DCs. Concretamente, la sobreexpresión de Bcl-2 por diferentes métodos en DCs de ratón resulta en un aumento en la duración del ciclo vital de estas células y una mayor resistencia a la apoptosis inducida por sepsis^{173,214}. Igualmente, la estimulación del eje CXCL12/CXCR4 en DCs intratímicas regula positivamente la supervivencia de estas células aumentando el ratio Bcl-2/Bax¹⁷¹. Por lo tanto, nuestro trabajo presenta a los ligandos BMP como factores noveles en el control de la supervivencia de las DCs a través, al menos en parte, de la regulación del balance en la expresión de Bcl-2 y Bax. Adicionalmente, la mayor expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 se ha relacionado con una mayor capacidad de las DCs para estimular la respuesta antígeno-específica de linfocitos T^{173,214}, lo cual podría estar relacionado con resultados que serán

comentados a continuación, y que demuestran que las iDCs cultivadas en presencia de BMP-4 adquieren una capacidad aloestimuladora aumentada.

Un interesante hallazgo de nuestro trabajo es el hecho de que la estimulación de la vía BMP promueva la maduración de las DCs. La adición al medio del ligando BMP-4 resulta en un incremento en la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD40, CD80 y CD86, al igual que de los marcadores de maduración CD83, PD-L1 y PD-L2, que alcanzan niveles comparables a los inducidos por estímulos clásicos de maduración de las DCs como son CD40-L y también LPS y TNF α . Este efecto inducido por la estimulación de la vía de señalización BMP sobre el fenotipo de las DCs es mediado por la vía canónica dependiente de las BR-Smads puesto que el bloqueo de la misma con el inhibidor DM anula dicho efecto. Simultáneamente, y además de regular la expresión de marcadores de maduración, la estimulación con BMP-4 da lugar a un incremento en la producción de citoquinas pro-inflamatorias, principalmente IL-8 y en menor medida IL-10, IL-6 y TNF α . En cambio, el tratamiento con BMP-4 no modifica la producción de IL-1 β por las iDCs.

De forma coherente con una mayor expresión de moléculas co-estimuladoras y una mayor producción de citoquinas, las iDCs presentan una capacidad aloestimuladora incrementada en respuesta a la estimulación de la vía de señalización BMP. Como se comentará más adelante, toda una serie de trabajos evidencian una estrecha relación entre las proteínas BMP y diferentes estímulos empleados para la maduración de las DCs. Esta asociación parece sugerir que los ligandos BMP podrían estar funcionando como mediadores de la activación inducida por diferentes estímulos madurativos en las DCs y, por lo tanto, no es de extrañar que por sí solas tengan efectos muy similares a esos estímulos. En contraposición a nuestros resultados, Pluchino y col¹⁰⁵ describieron que BMP-4 tiene un efecto negativo sobre la maduración en respuesta a LPS de las DCs obtenidas a partir de médula ósea de ratón y sobre su capacidad para re-estimular linfocitos T CD4⁺ antígeno-específicos. La adición de BMP-4 durante la maduración de las DCs inducida por LPS resultó en una menor expresión de CD80 y CD86 y en un aumento ligero en la fosforilación de p38 MAPK y Erk1/2. Ambos efectos fueron parcialmente revertidos por la presencia de Noggin. Sin embargo, los autores no lograron detectar ningún efecto sobre la fosforilación de Smad-1/5/8 en estos cultivos. El origen de las DCs empleadas en este estudio y el hecho de que respondan a ligandos

BMP activando exclusivamente rutas no canónicas de señalización, son factores clave para entender las discrepancias entre los resultados de ambos trabajos.

El proceso de endocitosis, tanto la inespecífica como la mediada por receptor, no resultó disminuido tras la estimulación de la vía de señalización BMP en iDCs, como cabría esperar, dado que la disminución de la actividad endocítica de las DCs tras la maduración es uno de los fenómenos que caracterizan dicho proceso²¹⁵. Esta reducción parece estar mediada principalmente por las GTPasas Cdc42 y Rac-1 y la proteína HS1, a través de rutas diferentes a las que regulan el resto de fenómenos que también tienen lugar durante la maduración²¹⁵⁻²¹⁹. En este sentido, Garrett y col²¹⁷ demostraron cómo la microinyección en mDCs derivadas de médula ósea de la forma activa de la proteína Cdc42 restauraba su capacidad endocítica sin afectar al resto de características maduras. Más recientemente, dos trabajos han descrito que las DCs de bazo de ratón que habían madurado *in vivo* mediante la inoculación de diferentes estímulos, mantienen su capacidad para endocitar y presentar antígenos nuevos^{220,221}. Por lo tanto, las proteínas BMP activarían en las iDCs rutas de señalización que no mediarían en la regulación de la capacidad endocítica de estas células pero sí en la adquisición de determinadas características maduras.

En cuanto a los mecanismos moleculares que podrían mediar la inducción de características maduras promovida en las iDCs en respuesta a ligandos BMP, como se ha discutido con anterioridad, las DCs responden a la estimulación de la vía de señalización BMP aumentando la transcripción de los genes *ID*. Estas proteínas, principalmente ID2, han sido ampliamente relacionadas con el desarrollo y diferenciación de diferentes subtipos de DCs¹⁸²⁻¹⁸⁴ y podrían, por tanto, participar en la mediación de los efectos inducidos por las BMPs. Sin embargo, no existen ningún trabajo que implique directamente a estas proteínas en la maduración de las DCs.

Por otro lado, los componentes de la familia de factores de transcripción RUNX han sido clásicamente descritos como mediadores moleculares de la respuesta a diferentes factores de crecimiento y diferenciación, incluyendo a componentes de la superfamilia del TGF β , como las proteínas BMP^{21,222,223}. Incluso se ha descrito que las proteínas RUNX interaccionan directamente con las proteínas BR-Smad en localizaciones subnucleares donde colaboran en la regulación de la expresión de genes

diana^{21,174}. Nuestros resultados demuestran que la estimulación de la vía de señalización BMP induce la expresión de los tres componentes de la familia RUNX en las iDCs, lo que podría tener correlación con el incremento en los niveles de transcripción de estos genes observados tras la maduración de estas células. De los tres miembros de esta familia de factores de transcripción, RUNX3 parece ser el que más se ha implicado en la maduración de las DCs¹⁷⁵⁻¹⁷⁸. Concretamente, se ha descrito un papel positivo de RUNX3 en la expresión de las integrinas CD11a/CD18 y CD49b en MoDCs humanas¹⁷⁵, mientras que, de forma aparentemente contraria, las DCs de ratones *knockout* para *runx3* se muestran insensibles al efecto inhibitor de TGFβ y ven incrementada su capacidad aloestimuladora en respuesta a LPS^{176,177}. Un posterior trabajo de Puig-Kröger y colaboradores describió la existencia de una isoforma de RUNX3 generada por *splicing* alternativo que se induce durante la maduración de las DCs y que controla negativamente la expresión de IL-8¹⁷⁸. Estos trabajos apuntan, por tanto, a un papel bivalente de los factores de transcripción RUNX en la maduración de las DCs. De esta forma, la hipótesis de que la adquisición de características maduras inducida en MoDCs por la estimulación de la vía de señalización BMP estaría mediada, al menos en parte, por un aumento en la expresión de los miembros de la familia de proteínas RUNX tiene, cuanto menos, un fundamento lógico.

Un punto de inflexión en este trabajo fue el descubrimiento de la capacidad de las DCs para producir BMPs y que esta producción se incrementara durante el proceso de maduración. Más concretamente, las iDCs producen niveles bajos de BMP-4 y la estimulación con citoquinas pro-inflamatorias induce un incremento paulatino de esta producción a lo largo del proceso de maduración. Además, el análisis por RT-PCR cuantitativa demuestra que la expresión de *BMP2* y *BMP6* también es fuertemente inducida, al menos a nivel de transcrito, a consecuencia de la maduración, mientras que la de *BMP7* muestra cierta tendencia a reducirse. Hay que destacar que este mismo fenómeno fue observado en la población de cDCs circulantes humanas CD1c (BDCA-1)⁺, donde el cultivo con el mismo cóctel de citoquinas pro-inflamatorias incrementa la expresión de *BMP2* y *BMP6* hasta 3 y 40 veces respecto a las células no estimuladas, sin afectar a la expresión de *BMP7*.

Por el contrario, el análisis de los resultados obtenidos por RT-PCR y ELISA demuestra que BMP-4 no se expresa en monocitos cultivados en ausencia de señales

exógenas. En línea con nuestros resultados, un estudio publicado en 2011 muestra que los monocitos no son capaces producir BMP-2 en respuesta a diferentes factores como LPS o tras su cultivo en diferentes superficies²²⁴, mientras que sí pudo detectarse producción de BMP-2 por estas células tras su cultivo en medio suplementado con dexametasona²²⁵. Es bastante probable que esta discrepancia entre resultados se deba a las diferencias en el cultivo de los monocitos.

El cóctel de citoquinas pro-inflamatorias empleado para la maduración de las DCs en este estudio fue el desarrollado hace ya unos 16 años por Jonuleit y colaboradores²²⁶. Este cóctel es el estímulo madurativo usado mayoritariamente en los ensayos clínicos de inmunoterapia con DCs e incluye los factores TNF α , IL-1 β , IL-6 y PGE2¹⁶². En la literatura pueden encontrarse numerosos trabajos que demuestran que la expresión de BMPs es inducida en diversos tipos celulares tras la estimulación con los diferentes componentes de este cóctel de citoquinas pro-inflamatorias, IL-6^{103,227-230}, así como IL-1 β ²³¹⁻²³⁴ y más claro si cabe PGE2^{179,235-238}. Sin embargo, es TNF α el factor más ampliamente estudiado por su capacidad para regular la expresión de las BMPs^{180,181,190,231,239-242}. Por este motivo, nos propusimos estudiar si TNF α , de entre las citoquinas pro-inflamatorias incluidas en el cóctel de maduración, era el único factor responsable de la inducción de la producción de BMPs en las DCs. La estimulación de las DCs solo con TNF α o con el cóctel de citoquinas pro-inflamatorias, pero sin TNF α , promovió la producción de BMP-4 de forma muy similar al cóctel completo.

Los resultados anteriormente descritos demuestran que TNF α no es un factor indispensable para la producción de BMPs inducida en DCs durante la maduración y sugieren que este fenómeno podría ser una característica inherente al proceso de maduración de estas células. Esta última hipótesis fue comprobada al medir la producción de BMP-4 en los sobrenadantes de DCs maduras con diferentes estímulos. El estudio centrado en la estimulación de las DCs con dos estímulos madurativos clásicos como son CD40-L y LPS permitió observar cinéticas de producción de BMP-4 muy parecidas a las observadas cuando el cóctel de citoquinas pro-inflamatorias era el estímulo empleado. Es más, la estimulación de las DCs con diferentes agonistas de los receptores TLR resultó en la inducción, en mayor o menor medida, de la secreción de BMP-4 al medio. Solo hubo una excepción, pues la estimulación de TLR-3 con su agonista, el análogo de ARN de doble cadena Poly I:C,

no dio lugar a la producción de BMP-4, lo cual será discutido más adelante. Estos últimos resultados indican que la producción de BMPs en las DCs también podría estar regulada positivamente por la activación de los TLRs. En esta línea, la proteína TAK1, con un papel principal en la activación de las MAPKs para la transducción de la señal TLR tanto a través de MyD88 como de TRIF²⁴³, ha sido descrita recientemente en diversos sistemas como una molécula mediadora de la vía de señalización BMP²⁴⁴⁻²⁴⁸. Más concretamente, TAK1 activa a las proteínas p38, Erk y JNK en respuesta a proteínas BMP²⁹ y además promueve y mantiene la señalización BMP a través de las proteínas Smads, demostrándose incluso su capacidad para fosforilar directamente a las BR-Smads^{245,246}. Entre los genes diana de las BR-Smads se encuentran aquellos que codifican para las BMPs, por lo que TAK1 podría actuar como puente entre la estimulación TLR y la vía de señalización BMP.

Respecto a la estimulación de TLR-3 con Poly I:C, mientras que el resto de TLRs transducen su señal de activación al núcleo a través de la proteína MyD88, a excepción de TLR-4 que emplea tanto MyD88 como TRIF, TLR-3 es el único cuya transducción se lleva cabo de forma exclusiva a través de la proteína TRIF²⁴³. Esto sugiere que la producción de BMP-4 inducida por la activación de los TLRs podría ser dependiente de la activación de la proteína MyD88, aunque el mecanismo molecular que estaría subyacente a este fenómeno no ha sido demostrado.

De forma aparentemente contradictoria, la adición del inhibidor DM durante la maduración inducida por Poly I:C tuvo un efecto negativo sobre la inducción de algunos de los marcadores de maduración expresados por las mDCs. Estos resultados se deben a que, a pesar de no inducir la secreción de BMP-4, la estimulación con Poly I:C resultó en una mayor expresión de *BMP6* (datos no mostrados), lo cual podría estar activando la vía de señalización BMP. Por lo tanto, podemos concluir que la maduración de las DCs en respuesta a un considerable número de estímulos promueve un aumento en la expresión de ligandos BMP por estas células.

Aunque el tratamiento con BMP-4 indujo la fosforilación de las proteínas BR-Smad y el incremento en la expresión de los genes *ID* en mDCs, dicho tratamiento no tuvo efecto sobre su fenotipo o su supervivencia. Este hecho podría estar sugiriendo que mecanismos reguladores secundarios a la fosforilación de las proteínas BR-Smad, y no

presentes en iDCs, podrían estar actuando a medio-largo plazo bloqueando los efectos de la adición exógena de ligandos BMP. Los componentes de la ruta canónica de señalización BMP, incluyendo antagonistas, son simultáneamente mediadores y genes diana, por lo que la activación de esta vía de señalización suele estar acompañada de una mayor expresión de elementos reguladores con el objetivo de afinar el control de la amplitud de la señal^{83,249}. En línea con este supuesto, se ha descrito que el cultivo de condrocitos de pacientes con osteoartritis en presencia de IL-1 β induce, además de la expresión de *BMP-2*, la transcripción de la proteína inhibidora Smad-7^{180,250} (revisado en²³¹). Por lo tanto, la supuesta activación autocrina/paracrina de la vía de señalización BMP que se induce en DCs en respuesta a citoquinas pro-inflamatorias podría activar a su vez una serie de mecanismos reguladores, como expresión de I-Smads, que estarían inhibiendo un posible efecto de la adición exógena de BMP-4 durante y después de la maduración.

Otro objetivo fue dilucidar cuáles de las vías de señalización que se sabe que son activadas durante la maduración de las DCs podrían estar mediando la inducción de la expresión de los ligandos BMP. La generación de compuestos inhibidores para el bloqueo específico de diferentes rutas y factores de transcripción han permitido a numerosos laboratorios abordar el estudio del papel de estas vías de señalización en el proceso madurativo. Haciendo uso de estos inhibidores, nuestros resultados muestran que de las tres MAPKs, p38, Erk-1/2 y JNK, ampliamente relacionadas con la maduración de las DCs, tan solo la inhibición de p38 tuvo un efecto negativo sobre la expresión de *BMP6*. Por su parte, el bloqueo de Erk-1/2 y JNK, así como el de la proteína quinasa Src y el factor de transcripción NFAT, no afectó a la expresión de ligandos BMP inducida por citoquinas pro-inflamatorias. Tanto las MAPKs Erk-1/2 y JNK^{148,251,252} (revisado en^{253,254}), como las proteínas de la familia Src^{255,256} y el factor de transcripción NFAT^{257,258} regulan principalmente la producción de citoquinas por las DCs estimuladas. Se podría pensar, por tanto, que la expresión de los ligandos BMP inducida durante la maduración de las DCs no es regulada por vías comunes a otras citoquinas. Por otro lado, la expresión de *BMP6* también se vio afectada, aunque en menor medida, por la inhibición de PKC y CaMKII, ambas proteínas quinasa activadas durante la maduración de las DCs e implicadas en la adquisición de características funcionales en estas células^{259,260} (revisado en²⁶¹). Igualmente pudo observarse un efecto

inhibidor muy similar a causa del bloqueo del factor de transcripción NF-KB, mediador, aunque no de forma exclusiva, de la mayoría de rutas hasta aquí descritas.

Como se ha adelantado más arriba, la vía de señalización de la MAPK p38, central en la maduración de las DCs, resultó ser la principal en la regulación de la inducción de las proteínas BMP durante la maduración de las DCs, dado que su inhibición reduce la expresión de *BMP6* más de un 60% y alrededor de un 90% la de *BMP2* (datos no mostrados). En correlación con nuestros resultados, la regulación de la expresión de proteínas BMP a través de la proteína p38 ya había sido descrita anteriormente por otros autores^{262,263}, aunque esta es la primera vez que esta relación es reportada en las DCs. Es más, como se ha comentado anteriormente, p38 modula la expresión de ID2 inducida por BMP-4 en las mDCs. Esta serie de evidencias podría sugerir que la producción de ligandos BMP durante la maduración de las DCs estaría regulada y potenciada, mediante un mecanismo de retroalimentación positiva, a través de la activación de la p38 MAPK.

En relación a la conexión entre p38 y el resto de rutas estudiadas, en diferentes sistemas se ha descrito que tanto PKC^{264,265}, como CaMKII^{266,267} pueden activar a p38, por lo que el efecto negativo de la inhibición de ambas proteínas sobre la expresión de ligandos BMP podría estar asociado precisamente a una menor activación de p38. De modo similar, el bloqueo de NF-KB también reduce la expresión de *BMP6*. Este factor de transcripción es regulado con frecuencia por p38^{268,269}, lo que podría sugerir que p38 regula la expresión de las proteínas BMP a través, en parte, de la activación de NF-KB. De nuevo apoyando el papel destacado de p38, se ha demostrado recientemente que la PI3K puede reprimir la activación de esta proteína a través de la regulación negativa de la MAPKKK ASK-1²⁷⁰. Este mecanismo podría explicar que la adición del inhibidor específico de PI3K resulte en un incremento en la expresión de *BMP6*, posiblemente a consecuencia de un aumento en los niveles de la forma activa de p38. En resumen, podríamos concluir que la expresión de ligandos BMP que se induce en las DCs en respuesta a citoquinas pro-inflamatorias está regulada por diversas rutas de señalización siendo la proteína MAPK p38 una pieza clave en esta regulación.

A tenor de los resultados que demuestran que la estimulación de la vía de señalización BMP induce la aparición de características maduras en las DCs, y dado que

la expresión de los ligandos BMP se ve incrementada en estas células tras la maduración con diferentes estímulos, parece lógico pensar que la vía de señalización BMP participa activamente en el proceso de maduración de estas células. El aumento en los niveles de la forma activa de las BR-Smads (Smad-1/5/8 fosforiladas) inducido por la estimulación con el cóctel pro-inflamatorio confirma que las proteínas BMP producidas por las DCs actúan como un factor autocrino/paracrino en estas células, activando la transducción de la señal BMP a través de la vía canónica. Además, la adición del inhibidor DM durante la maduración de las DCs redujo los niveles de Smad-1/5/8 fosforiladas, confirmando que dicha fosforilación es realizada de forma específica por los receptores de BMP tipo I.

Dado que la familia de proteínas ID son genes diana de la vía de señalización BMP en MoDCs, se estudió también su modulación a lo largo del proceso de maduración de las DCs como forma de confirmar la implicación de esta vía en dicho proceso. Mientras que la expresión de *ID1* tiende a disminuir ligeramente durante la estimulación con citoquinas pro-inflamatorias, la de *ID3* se reduce drásticamente tan pronto como a las 4 horas de estimulación para casi apagarse por completo a las 36 horas. De forma contraria, los niveles del transcrito de *ID2* se incrementan de forma paulatina a lo largo de la maduración de las DCs. Estos resultados estarían en consonancia con otras publicaciones ya comentadas que han implicado a miembros de la familia de proteínas ID, principalmente ID2, en la diferenciación y maduración de las DCs¹⁸²⁻¹⁸⁴. La adición simultánea de DM, inhibidor específico de la vía BMP canónica, junto con el cóctel de citoquinas pro-inflamatorias nos brindó la posibilidad de analizar la contribución de esta ruta sobre la modulación de los genes *ID* durante la maduración de las DCs. Este tratamiento disminuyó de forma considerable la reducción en la expresión de *ID1* e *ID3* y el incremento en la de *ID2*, siendo máximo este efecto a las 24 horas de estimulación y desapareciendo a las 36 horas. En base a estos resultados, por tanto, podemos concluir que la activación autocrina de la señalización BMP canónica estaría implicada en la regulación de los genes *ID* que se produce durante la maduración de las DCs, de forma temporalmente restringida a estadios tempranos y medios de este proceso.

Siguiendo con el estudio sobre la función que podría estar desempeñando la vía canónica de señalización BMP durante la maduración de las DCs, y haciendo uso del

compuesto inhibidor DM, se analizó el efecto del bloqueo de la vía BMP sobre la capacidad de estas células para incrementar la expresión de diferentes marcadores de maduración y de producir factores solubles en respuesta a la estimulación. Las DCs que maduran en presencia de DM expresan niveles muy similares a las control de HLA-DR, del marcador de maduración CD83 y de las moléculas co-estimuladores CD40, CD80 y CD86. Asimismo, el tratamiento con DM no altera la secreción al medio de IL-8 e IL-12p70, mientras que la liberación de IL-10 se incrementa muy ligeramente respecto a las DCs que maduran en situación control. Sin embargo, el bloqueo de la vía canónica de señalización BMP durante la maduración de las DCs reprime el incremento en la expresión de los ligandos de PD-1, PD-L1/B7-H1 y PD-L2/B7-DC, propio de este proceso. Hay que destacar que este mismo efecto visto en las MoDCs se observa también en las cDCs de sangre periférica, indicando que la regulación de los PD-Ls por la ruta BMP no es un mecanismo exclusivo de las MoDCs, sino que también está presente en otras poblaciones de DCs. Es más, el papel de la señalización BMP en la regulación de la expresión de los PD-Ls en cDCs se vio apoyado por los resultados que muestran que la activación exógena de esta vía por la adición de BMP-4 incrementa el porcentaje de células PD-L1⁺, aunque la expresión de PD-L2 no se modifica. Dado que PD-L2 no se expresa de forma constitutiva en las cDCs, es probable que su inducción requiera de una estimulación más potente que la proporcionada por la adición del ligando BMP-4.

Nuestros resultados demuestran por primera vez una relación entre la vía de señalización BMP y la expresión de PD-L1 y PD-L2 en las DCs, lo cual se relaciona con el tipo de respuesta que van a inducir en otras células. PD-1 es una molécula de membrana de carácter inmunosupresor que se expresa de forma inducible en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, en células NK, células NKT y en linfocitos B^{144,145}. Aunque también se ha descrito en humano su expresión inducida vía TLR en monocitos y DCs periféricas CD11c⁺²⁷¹, la implicación de PD-1 en procesos de inmunidad y tolerancia se debe principalmente a su expresión en linfocitos^{144,145,272}. Es por ello que sus ligandos, PD-L1 y PD-L2, descritos por primera vez en 1.999 y 2.001, respectivamente, han sido estudiados con creciente interés en los últimos años^{151,273}. PD-L1 y PD-L2 son glicoproteínas transmembrana tipo I, comparten entre ellas un 40% de identidad en la secuencia de aminoácidos y pertenecen a la familia B7 de moléculas co-estimuladoras²⁷⁴. Aunque se ha sugerido que estas moléculas podrían funcionar como

ligandos que señalizan de forma reversa^{275,276}, su principal función inmunosupresora la ejercen a través de su unión al PD-1 expresado en otra célula. En cuanto a su expresión, PD-L1 está presente de forma constitutiva en un gran número de tejidos adultos sanos, mientras que la presencia de PD-L2 está mucho más restringida^{151,277-279} (resumido en¹⁴⁵). Ambos ligandos son inducibles en respuesta a gran variedad de estímulos y han sido implicados en un número considerable de desordenes patológicos. Tal vez la mayor ubicuidad de PD-L1 ha llevado a que sea éste el ligando de PD-1 más estudiado.

En el sistema inmunológico, se ha descrito en ratón que ambos ligandos son expresados en timo, mientras que solo PD-L1 se expresa en bazo. El papel inmunomodulador de la interacción PD-1/PD-Ls ha sido apoyado por numerosos trabajos que demuestran la implicación de estas moléculas en desordenes autoinmunes^{280,281}. Es más, el bloqueo de la interacción PD-1/PD-L1 en un modelo de trasplante conduce a un rechazo acelerado del injerto²⁸², lo cual hace evidente el carácter inmunosupresor de esta interacción. En esta línea, se ha descrito que la señal PD-1/ligandos es explotada por virus y tumores para protegerse ante el ataque de células del sistema inmunitario²⁸³⁻²⁸⁵. En correlación con estos trabajos, se ha descrito la expresión de PD-L1 y PD-L2 en linfocitos T, macrófagos, monocitos, linfocitos B, y en mastocitos derivados de médula ósea, cuya función sería la de regular su interacción con otros tipos celulares^{146,276,278,286,287} (revisado en^{144,145,274}).

Varios trabajos muestran la expresión de los ligandos de PD-1 en las DCs, siendo esta expresión constitutiva, en el caso de PD-L1, e inducible, en el caso de PD-L1 y PD-L2¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Más en particular, Breton y colaboradores demostraron la capacidad de las MoDCs para incrementar la expresión de PD-L1 y PD-L2 en respuesta a una gran variedad de estímulos²⁸⁸. Sin embargo, los mecanismos moleculares que regulan la expresión de los PD-Ls en las DCs no han sido tan ampliamente estudiados. En un estudio publicado en 2003, los autores encontraron que las DCs de ratones deficientes para STAT4, STAT6 y NF-KB no exhiben alteraciones en la expresión de PD-L1, mientras que la ausencia de STAT6 y NF-KB sí redujo la expresión únicamente de PD-L2 en respuesta a LPS, IL-4 e IFN γ ²⁸¹. Asimismo, Karakhanova y colaboradores, analizando el efecto de la inhibición de las MAPK p38 y MEK y de PI3K sobre la expresión de PD-L1 en diferentes subpoblaciones de DCs, encontraron que la expresión

de dicho ligando inducida por citoquinas pro-inflamatorias en las MoDCs era fuertemente dependiente de la activación de MEK, PI3K y, en menor medida, p38¹⁴⁸. Como ya se ha comentado, en las DCs estas proteínas son mediadores primarios de rutas de señalización cuya activación es esencial en la respuesta a citoquinas, por lo que no es sorprendente que su inhibición provoque alteraciones notables en un fenómeno asociado a esta respuesta como es el aumento en la expresión de PD-L1. Nuestro trabajo, sin embargo, demuestra que la expresión de PD-L1 y PD-L2 es controlada en parte por la vía BMP canónica en las MoDCs y las cDCs, implicando por primera vez a una ruta independiente a la estimulación con citoquinas en la regulación de estas moléculas. No obstante, aunque el efecto de la inhibición de las proteínas Smad sobre la expresión de los PD-Ls es específico y de considerable magnitud, el bloqueo observado no fue absoluto. Puesto que la DM actúa inhibiendo únicamente la vía canónica de señalización BMP, es posible que rutas alternativas dependientes o independientes de BMP, como es el caso de las vías de p38, MEK/Erk y PI3K, también podrían estar participando en esta regulación.

Por lo que respecta a la señales que la DC proporciona a nivel de membrana, el desenlace de la interacción DC-linfocito T va a estar sujeto al balance entre moléculas co-estimuladoras y co-inhibidoras expresadas por las DCs^{144,272}. En relación a esto, el ratio entre ambos tipos de moléculas ha sido correlacionado en varios estudios con la mayor o menor capacidad inmunogénica de las DCs e incluso propuesto como marcador de pronóstico en pacientes con infección por VIH²⁸⁹⁻²⁹¹. En nuestro sistema experimental, la menor expresión de los PD-Ls a causa del bloqueo de la señalización BMP canónica resulta en un incremento de alta significación estadística de los ratios entre CD80, CD86, CD40 y PD-L1 y PD-L2. Estos resultados indican que las mDCs tratadas con DM exhiben una clara ventaja en su perfil de moléculas co-estimuladoras, lo cual sugiere que podrían presentar una habilidad inmunoestimuladora aumentada.

Para evaluar este último punto se analizó primeramente la capacidad de estas DCs para inducir la respuesta proliferativa y la producción de citoquinas en linfocitos T CD4⁺ vírgenes alogénicos. Tal y como la caracterización fenotípica sugería, las DM-mDCs estimulan la proliferación de las células T de forma más eficiente que las mDCs control, lo cual es acompañado por un incremento en la producción de IL-2, citoquina estrechamente asociada a la respuesta proliferativa de los linfocitos T. Multitud de

trabajos muestran resultados muy similares a los aquí presentados como consecuencia del bloqueo del eje PD-1/PD-Ls durante la interacción DC-célula T. Concretamente, se ha descrito que la adición de anticuerpos bloqueantes contra PD-L1 y PD-L2 es capaz de incrementar la respuesta proliferativa y producción de citoquinas por linfocitos T^{279,292}, e incluso de restaurar la respuesta *in vitro* de las células T de pacientes afectados de patologías crónicas de origen infeccioso, como son la Hepatitis C, la Hepatitis B y el SIDA entre otros, asociadas a aparición de linfocitos T exhaustos que expresan altos niveles de PD-1 en membrana^{283,285,293}. En este mismo sentido, en un modelo de trasplante, la sobreexpresión de PD-L1 en DCs reprime la respuesta de los linfocitos T CD8 mejorando la supervivencia de los individuos transplantados²⁹⁴.

Los datos encontrados en la literatura apoyan nuestra hipótesis según la cual una menor expresión de los PD-Ls, como la observada en DM-mDCs, sería la principal causa del aumento en la respuesta proliferativa y la producción de IL-2 inducida en los linfocitos T. Sin embargo, y de forma contraria a lo que cabría esperar, los niveles de IFN γ no se vieron incrementados en estos cultivos. No obstante, Wei y colaboradores²⁹⁵ han publicado muy recientemente un estudio donde, haciendo uso de un elegante modelo de presentación antigénica *in vitro*, demuestran que la magnitud de la señal PD-1/ligandos no afecta por igual a todas las funciones efectoras de los linfocitos T. Mediante su modelo experimental, consiguen demostrar que en la respuesta antígeno-específica la señalización PD-1/PD-L1 afecta principalmente a la proliferación de las células T. La entrada de Ca²⁺ hacia el citoplasma y la producción de IL-2 también se mostraron especialmente sensibles a sobreexpresión de PD-1 por linfocitos T, mientras que el bloqueo de la producción de IFN γ y MIP-1 β requiere niveles de expresión de PD-1 muy superiores. Por lo tanto, es posible que el bloqueo de la vía canónica de señalización BMP durante la maduración de las DCs provoque una disminución en la expresión de los PD-Ls suficiente para aumentar su capacidad para estimular la proliferación y producción de IL-2 en linfocitos T pero no de la magnitud necesaria para afectar a la producción de IFN γ .

De forma muy similar a los resultados obtenidos en relación a la estimulación de los linfocitos T CD4⁺, las DM-mDCs inducen de forma más eficiente la actividad citotóxica de las células NK contra la línea tumoral K562, a pesar de que los niveles de

IFN γ en estos co-cultivos se encuentran disminuidos. Los resultados obtenidos en los últimos años sobre el diálogo cooperativo existente entre DCs y células NK le han dado a esta interacción un papel central en el inicio y desarrollo de la respuesta inmunitaria²⁹⁶⁻²⁹⁸. Según se ha descrito, las células NK en reposo requieren la participación de APCs para alcanzar una competencia completamente funcional. La activación de las células NK por las DCs se denomina "primado" y, aunque requiere la participación de factores solubles, depende en gran medida del contacto celular. Este contacto no solo facilita la respuesta a las citoquinas producidas por las DCs, principalmente IL-12 e IL-18, y la trans-presentación de IL-15, si no también la concentración de receptores de membrana y moléculas de adhesión que van a condicionar el desenlace de esta interacción²⁹⁹.

En nuestro contexto, cabe destacar que varios grupos han demostrado un incremento en la capacidad citotóxica de células NK contra células tumorales y células infectadas gracias al bloqueo, tanto *in vivo* como *in vitro*, de la señal PD-1/PD-L1³⁰⁰⁻³⁰³. Igualmente, la expresión de PD-1 en células NK durante procesos de infección crónica por virus ha sido recientemente relacionada con la alteración de las funciones efectoras de estas células de forma muy similar a la de los linfocitos T CD8⁺ exhaustos^{304,305}. De forma paralela, se ha visto que el cultivo de células NK primarias con IL-15, al igual que con IL-2, incrementa la expresión de PD-1^{300,304}. El hecho de que ambas citoquinas sean producidas por DCs sugiere que durante la interacción DC-NK la expresión de PD-1 podría ser inducida en las células NK, de forma que su unión a PD-L1/2 entraría a formar parte de las señales inhibitoras que, junto a las activadoras, son integradas en el diálogo entre DCs y NKs. Por lo tanto, podría plantearse que la mayor citotoxicidad inducida en las NKs por contacto con las DM-mDCs podría deberse a la menor expresión de PD-L1 y PD-L2 observada en estas células. Por otro lado, la menor producción de IFN γ inducida por las DM-mDCs hace difícil poder descartar la participación de otros factores en esta interacción.

Los factores de transcripción de la familia IRF han demostrado ser claves en la diferenciación y el desarrollo de la mayoría de subpoblaciones de DCs descritas hasta la fecha^{186,187}. De entre los miembros de la familia IRF, IRF1 es uno de los más estudiados en cuanto a su capacidad para regular diferentes aspectos característicos de las DCs maduras. Principalmente, IRF1 regula la producción de IL-12 por DCs, aunque también

se ha postulado su participación en la expresión del marcador de maduración CD83³⁰⁶⁻³⁰⁹. Además, IRF1 ha sido propuesto como un factor clave en la regulación de la expresión de PD-L1, puesto que su unión a la región promotora de *PD-L1/CD274* es un requisito indispensable para la expresión, tanto constitutiva como inducida por IFN γ , de este gen en la línea celular humana de cáncer de pulmón A549¹⁸⁹.

En base a estas publicaciones, IRF1 se presentaba como un candidato efector para mediar los efectos observados en DM-mDCs. Efectivamente, y en correlación con la menor expresión de PD-L1/2, el bloqueo de la vía canónica de señalización BMP durante la maduración de las MoDCs reduce de forma importante los niveles del transcrito de *IRF1* así como el porcentaje de células con una elevada expresión de la proteína, que llega a reducirse hasta a un tercio del valor de las células control. Es importante destacar que el tratamiento con DM no altera los niveles de transcripción de *IRF8*, otro miembro de la familia de factores de transcripción IRF estrechamente asociado al control de la funcionalidad de las DCs^{310,311}. Dos resultados de este trabajo apuntan a que el gen *IRF1* podría ser un gen diana de la vía canónica de señalización BMP durante la maduración de las DCs. Por un lado, la presencia del inhibidor DM durante la maduración de las DCs bloquea casi por completo el aumento en la transcripción de *IRF1* tan pronto como a las 4 horas de estimulación y de forma mantenida hasta al menos las 10 horas. Por otro lado, la estimulación de iDCs con BMP-4 induce, aunque discretamente, la expresión de *IRF1*, mientras que la adición de DM reduce esta expresión por debajo de niveles basales. Estos últimos resultados son interesantes pues indican que la vía canónica de señalización BMP endógena en las DCs participaría de forma directa sobre la expresión de *IRF1*.

En cuanto a la regulación transcripcional de *IRF1*, Hu y colaboradores han descrito la existencia de secuencias de DNA de unión a STAT (secuencias GAS) presentes en la región promotora de *IRF1* y que la estimulación de MoDCs con citoquinas induce la unión a estas secuencias de un complejo de proteínas entre las que proteínas podría encontrarse STAT1¹⁸⁸. Estos resultados podrían estar relacionados con nuestros hallazgos, pues se ha visto que proteínas Smad y STAT pueden interaccionar físicamente gracias al co-activador transcripcional p300, que actuaría como puente entre ambas proteínas³¹². Se podría especular, por tanto, que la expresión de *IRF1* inducida durante la maduración de las DCs podría ser mediada en colaboración por proteínas

Smad y STAT. Asimismo, se ha descrito que la estimulación de macrófagos con TNF α induce la activación no canónica y tardía (a las 24 horas) de STAT1³¹³. Este mecanismo podría explicar que, a pesar de encontrarse siempre por debajo del control, la transcripción de *IRF1* en las DM-mDCs se vea incrementada a las 24 horas de estimulación a causa de la acción de proteínas STAT y de forma independiente de las proteínas BR-Smad.

De forma muy similar a los resultados obtenidos en las MoDCs, el bloqueo de la vía BMP canónica durante la maduración de las cDCs tuvo el mismo efecto sobre la expresión de IRF1 a nivel de proteína, lo que apoya que la regulación de IRF1 por la vía BMP no es un mecanismo exclusivo de las MoDCs, sino que es compartido por otras subpoblaciones de DCs.

Para comprobar si efectivamente la expresión inducida de los PD-Ls se produce a través del factor de transcripción IRF1 en las DCs, se empleó la técnica de silenciamiento génico mediante siRNAs específicos. El silenciamiento de IRF1 en las iDCs provocó una reducción en la expresión de PD-L1 y PD-L2 equivalente al efecto del tratamiento con DM, es decir, sin afectar a la expresión del resto de marcadores estudiados. Sin embargo, el bloqueo en la inducción de los PD-Ls a causa del silenciamiento de IRF1 fue de menor magnitud que el inducido por la inhibición de la ruta BMP. Todo esto a pesar de que la reducción en los niveles del transcrito de *IRF1* fue comparable entre ambos casos. Una posible explicación a estos resultados aparentemente controvertidos, sería la posibilidad de que la vía BMP regule los niveles de IRF1 por mecanismos adicionales a la transcripción génica, como los propuestos por otros autores para miembros de la familia de factores de transcripción IRF³¹⁴ y del propio IRF1^{315,316}.

En resumen, este es el primer trabajo que propone a *IRF1* como gen diana de la vía canónica de señalización BMP, implicando al eje BMP/IRF1 en el incremento en la expresión de PD-L1 y PD-L2 inducido en respuesta a citoquinas pro-inflamatorias en MoDCs y cDCs. No obstante, no se puede descartar que esta vía podría no ser la única implicada en la regulación de la expresión de los PD-Ls, pues otros mecanismos moleculares han sido implicados previamente^{148,286,317,318}. Estos mecanismos alternativos, que implican principalmente a las proteínas STAT y a diferentes MAPKs,

podrían explicar también que el bloqueo de la DM sobre la inducción en la expresión de los PD-Ls no sea absoluto.

En relación a la posible relevancia de la capacidad de las proteínas BMP de inducir la maduración funcional y fenotípica de las DCs, varios autores han descrito un incremento en la expresión de los ligandos BMP en diversos desórdenes patológicos en los que toman parte las DCs. Estos desórdenes incluyen cáncer y otros procesos inflamatorios como asma, aterosclerosis, esclerosis múltiple y artritis reumatoide^{64,319-324}. En este contexto, el encuentro de la DCs presentes en el tejido con un microambiente enriquecido en BMPs podría inducir en estas células un incremento en la expresión de moléculas co-estimuladoras y en la producción de citoquinas pro-inflamatorias. La habilidad de estas DCs con características maduras para seguir captando antígenos, sumado a su capacidad aumentada para estimular linfocitos T CD4⁺, podría suponerles un papel importante en la iniciación y perpetuación de estas patologías. Un ejemplo ilustrativo para esta hipótesis podría ser la aterosclerosis, en la que se ha visto que las turbulencias a las que están expuestas regiones arteriales afectadas preferencialmente por esta patología, son suficientes para inducir la producción de BMP-4 por el endotelio⁶⁶. La posible respuesta a este ligando de las DCs que residen en la lámina íntima de estos vasos induciría la maduración de estas células, por lo que este fenómeno podría participar activamente en la iniciación de la consecuente inflamación asociada a la aterosclerosis.

Por otro lado, y en relación con los datos aportados que apoyan que las DCs humanas producen ligandos BMP que regulan de forma autocrina/paracrina la expresión de PD-L1 y PD-L2 durante la maduración, estos hallazgos podrían tener especial relevancia en el contexto de las estrategias actuales para la mejora *ex vivo* de vacunas anti-tumorales basadas en DCs. Aunque la inmunoterapia con DCs ha sido probada como clínicamente segura y eficaz en la inducción de una respuesta inmunitaria específica contra el tumor, sólo se ha reportado un número muy limitado de pacientes de cáncer con los objetivos clínicos alcanzados¹⁶². La inducción de tolerancia y la supresión de la respuesta inmunitaria mediada por las células tumorales y su microambiente, así como las condiciones subóptimas para generar DCs immunoestimuladores suficientemente potentes, son los principales factores que han contribuido al limitado éxito clínico^{162,325}. Por tanto, la modificación de las propiedades

funcionales de las DCs representa una estrategia atractiva para la mejora de su capacidad inmunogénica y, por ende, para potenciar la eficacia de estas vacunas. Diferentes acercamientos en esta dirección ya han sido llevados a cabo e incluyen la adición de potenciadores inmunitarios así como la inhibición de factores inmunosupresores como son SOCS-1, IDO ó el propio eje PD-1/PD-Ls^{161,325,326}. En este contexto, nuestros resultados, que muestran que la manipulación de la vía de señalización BMP, mediante la adición del inhibidor DM, durante el proceso de maduración de las DCs aumenta su capacidad para estimular a linfocitos T sin afectar al resto de características estudiadas, podrían ser de interés en el campo de la inmunoterapia.

Como ya se ha comentado, la principal característica que ha llevado a las DCs a ser consideradas una pieza clave en la respuesta inmunitaria adaptativa es su capacidad para la captación de antígenos, madurar y llevar a cabo la presentación antigénica a linfocitos T vírgenes. Gracias a su gran capacidad migratoria, el antígeno captado en la periferia es transportado de forma eficiente a las regiones T de los ganglios linfáticos¹⁰⁹. La comunicación entre DCs y células T se rige por lo que algunos autores han dado en llamar la hipótesis de las "tres señales", donde la "señal 1" hace referencia a la interacción TCR-MHC y la "señal 2" a la co-estimulación dependiente de moléculas de membrana^{161,327,328}. Dado que las DCs secretan diferentes citoquinas durante la presentación antigénica que van a condicionar la respuesta y diferenciación de las células T, este conjunto de factores solubles secretados por las DCs y otras APCs se engloba en lo que sería la "señal 3" y parece jugar un papel esencial en la adquisición de las características efectoras maduras de las diferentes subpoblaciones de células T^{125,329}. En base a esto, parece lógico pensar que los ligandos BMP producidos por DCs tras la maduración podrían actuar también modulando la respuesta de los linfocitos T.

Como primer acercamiento al estudio de esta hipótesis, nuestros resultados muestran que los linfocitos T CD4⁺ vírgenes humanos activados vía TCR expresan a nivel de transcrito tanto los receptores tipo I de BMP (*BMPRIA/ALK-3*, *BMPRIB/ALK-6* y *ActRIA/ALK-2*) y el receptor tipo II (*BMPRII*, datos no mostrados), como los miembros del grupo de proteínas BR-Smad y la Co-Smad/Smad-4. A diferencia de lo que sucedía en el caso de las DCs, la relación entre los linfocitos T y las BMPs es un campo relativamente más explorado. En lo que se refiere a células T maduras, nuestro grupo describió previamente que los linfocitos T CD4⁺ de ganglio linfático de ratón expresan *BMPRIA*, *BMPRIB* y *ActRIA* y que esta expresión se incrementa en respuesta a la estimulación con anti-CD3/anti-CD28⁸¹. En humano, líneas celulares linfoblásticas expresan mayoritariamente los receptores *ActRII* y *BMPRIA*, mientras que la expresión de *BMPRII* y *BMPRIB* es mínima o inexistente¹⁹⁴. Por otro lado, también se ha descrito que tanto la línea celular Jurkat T como los linfocitos T CD4⁺ de sangre periférica presentan en membrana de forma diferencial los receptores *ActRIA*, *BMPRIA* y *BMPRII*, estando esta expresión asociada a células T efectoras en el último caso⁸³.

Más importante aún, y en consonancia con anteriores publicaciones^{83,194}, nuestros resultados demuestran que la estimulación durante una hora con el ligando

BMP-4 es suficiente para modular la expresión de ID1-3 en linfocitos T CD4⁺ activados. Se confirma así que los genes *ID* se comportan como genes diana de la señalización BMP también en células T y que estas células son capaces de responder a la estimulación con BMPs. Este conjunto de datos sugiere que los linfocitos T CD4⁺ podrían ser diana de las proteínas BMP producidas por las mDCs.

Nuestros resultados muestran también que la expresión de BMPRIA en los linfocitos T CD4⁺ vírgenes se induce rápidamente en respuesta a la estimulación con anti-CD3/anti-CD28 incrementando gradualmente el porcentaje de células positivas para este receptor hasta alcanzar un máximo del 25-30% a los 5 días de activación. La expresión de BMPRIA se asocia preferentemente con las células T activadas, lo cual había sido descrito anteriormente por nuestro grupo en linfocitos T CD4⁺ periféricos de ratón⁸¹ y podría indicar que las células competentes para responder a los ligandos BMP son precisamente aquellas que responden a la estimulación vía TCR. Es más, la activación de las células T mediante la estimulación con el mitógeno ConA o el tratamiento combinado con PMA más ionomicina, que inducen activación TCR dependiente e independiente respectivamente, también induce la expresión de BMPRIA preferentemente en células T CD4⁺/CD25⁺. Estos resultados sugieren que la inducción de la expresión de BMPRIA y su asociación con la expresión de CD25 es un fenómeno ligado a la activación de los linfocitos T CD4⁺, independientemente de la naturaleza del estímulo activador.

Con el objetivo de extrapolar los resultados obtenidos *in vitro* a un sistema *in vivo*, se aprovecharon los resultados de un estudio en individuos trasplantados de médula ósea en los que se analizó la expresión diferencial de BMPRIA en la población CD3⁺ y en función del posterior desarrollo de EICH agudo. El análisis de estas muestras evidencia una correlación entre la progresión de esta enfermedad y su tratamiento con la expresión de BMPRIA en los linfocitos T del paciente. Concretamente, el desarrollo de la EICH incrementa el porcentaje de células T positivas para BMPRIA en el momento del diagnóstico y, más interesante aún, este porcentaje se reduce drásticamente a consecuencia del tratamiento con inmunosupresores y posterior remisión de la patología. Puesto que la EICH es un síndrome que culmina en inflamación sistémica y en el cual es bien conocido el papel central de los linfocitos T como células efectoras^{195,330}, es muy probable que, al igual que sucedía *in vitro*, la expresión de

BMPRIA se dé de forma mayoritaria en linfocitos T activados. El hecho de que la expresión de BMPRIA se reduzca tras el tratamiento inmunosupresor de los pacientes también apoya el que la expresión de BMPRIA en las células T esté asociada a un estado activado de estas células.

Una posible explicación para el incremento en la expresión de BMPRIA en los cultivos de linfocitos T podría ser la presencia de una subpoblación linfocitaria BMPRIA⁺ minoritaria, presente en la población inicial, que podría resultar expandida gracias a estimulación vía TCR. Esta cuestión fue abordada mediante la separación y posterior cultivo de las células T activadas CD25⁺ en función de si expresaban o no BMPRIA. Aproximadamente la mitad de las células CD25⁺BMPRIA⁺ puestas en cultivo pierden la expresión en membrana de BMPRIA tras 36 horas de re-estimulación con anti-CD3/anti-CD28, mientras que, por el contrario, las mismas condiciones de cultivo inducen en las células CD25⁺BMPRIA⁻ la aparición de aproximadamente un 10-15% de células con una alta expresión de BMPRIA. Como hemos discutido anteriormente en relación con los resultados correspondientes a las DCs, la endocitosis de los receptores de BMP una vez captado el ligando es un hecho crucial para la posterior transducción de la señal. Además de este mecanismo modulado principalmente por la presencia de ligando, también se ha descrito que los receptores de BMPs experimentan endocitosis de forma constitutiva en ausencia de ligando, mostrando una vida media para su presencia en membrana de aproximadamente 14 minutos³⁵. Este mecanismo, típico de proteínas con una alta tasa de renovación en membrana, no es extraño en linfocitos T CD4⁺. Concretamente, se ha descrito en estas células que la proteína CTLA-4 sufre endocitosis constitutiva dependiente de clatrina y dinamina incluso durante la activación vía TCR o por estimulación con PMA/ionomicina, y que dicho tráfico celular toma parte en la regulación del reciclaje y la degradación de esta molécula³³¹. Aunque no se puede asegurar que este sea el caso del receptor BMPRIA, nuestros resultados sugieren que la expresión en membrana de BMPRIA se podría producir de forma cíclica en las células T a lo largo del cultivo con anticuerpos anti-CD3/anti-CD28 y, por lo tanto, a lo largo de la activación.

Una vez comprobado que la activación promueve en las células T la competencia para responder a las proteínas BMP, se analizó el efecto que un aporte exógeno de estos ligandos podría tener sobre aspectos fundamentales de la activación de

estas células. La estimulación de la vía de señalización BMP mediante la adición de BMP-2 y BMP-4 incrementó la respuesta proliferativa de las células T inducida por la activación con anti-CD3/anti-CD28. Tanto BMP-2 como BMP-4 indujeron también un aumento en la expresión del marcador de activación CD25 y en la producción de las citoquinas pro-inflamatorias TNF α e IFN γ . Igualmente, el tratamiento con ambos ligandos resultó en una mayor producción de IL-2. Estos resultados, novedosos en humano, se encuentran estrechamente relacionados con los presentados en otros estudios, aunque pueden encontrarse ciertas discrepancias. Por un lado, Tzachanis y colaboradores no lograron detectar fosforilación de Smad-1 inducida por estimulación con BMPs en células T CD4⁺ humanas en reposo, ni pudieron observar un efecto de BMP-2 y BMP-4 sobre la respuesta proliferativa producida durante la activación con anti-CD3/anti-CD28. Sin embargo, estas células sí expresaban los transcritos de *BMPRIA* y *BMPRII* y la transcripción de *SMADI* era incrementada en respuesta a la estimulación del TCR¹⁹⁶. Por otro lado, en la línea celular Jurkat T, la estimulación con BMP-6 induce la fosforilación de Smad-1/5/8 y de las MAPKs Erk y p38 y afecta negativamente a la proliferación basal de estas células a través de un incremento en la expresión de *ID1*⁸³.

Por el contrario, y en mayor consonancia con nuestros resultados, cuando linfocitos CD4⁺ de bazo de ratón primados en presencia de BMP-2 o BMP-4 son re-estimulados con APCs irradiadas puede observarse un ligero aumento en la proliferación⁸². En este caso, los autores de este estudio sí consiguieron detectar fosforilación de Smad-1 en respuesta a BMP-2 o BMP-4 en células T CD4⁺ en reposo. Siguiendo esta línea, nuestro grupo ha demostrado previamente que los ligandos BMP-2 y BMP-4 afectan de forma diferencial a la respuesta proliferativa de linfocitos T CD4⁺ de ganglios linfáticos de ratón inducida vía TCR, siendo este efecto negativo y positivo respectivamente para cada ligando⁸¹. También en linfocitos T CD4⁺ de ratón se ha descrito que el bloqueo de la señalización BMP inhibe de forma específica la fosforilación de Smad-1/5/8 inducida por BMP-2 sin afectar a la de Smad-2, mediador de la señalización TGF- β . La presencia de este tratamiento durante la activación de estas células reduce de forma considerable la proliferación inducida por la señalización TCR produciendo un arresto en la fase G₀/G₁ del ciclo celular a causa de la acumulación de p27^{kip1}⁸⁵. Asimismo, en este modelo experimental, la producción de IL-2 y la expresión de CD25 también se vieron afectados, posiblemente a causa de la

disminución en los niveles Runx1 activado. Finalmente, en células T CD8⁺ efectoras se ha visto que miembros de la superfamilia TGF- β , BMP-4 entre ellos, incrementan la producción de IFN γ que ocurre durante la respuesta antígeno-específica⁸⁴. Todo estos trabajos aportan una serie de evidencias que apuntan a que la vía de señalización BMP podría desempeñar una función reguladora de diferentes características efectoras de las células T y, más concretamente, apoyan la hipótesis de que la estimulación de la vía de señalización BMP durante la activación de los linfocitos T CD4⁺ regula positivamente la proliferación y la producción de citoquinas por estas células.

De forma muy similar a lo observado en el modelo de activación con anti-CD3/anti-CD28, el contacto con mDCs induce en las células T CD4⁺ la expresión en membrana de BMPRIA. Mientras que en los cultivos de linfocitos T aislados se mantuvieron niveles mínimos de expresión de BMPRIA, en los co-cultivos mDC-linfocito T se incrementó de forma gradual el porcentaje de células CD3⁺CD4⁺BMPRIA⁺. Como era de esperar, aquellas células que proliferaban en respuesta a la estimulación con mDCs son las que expresaron de forma mayoritaria los marcadores de activación CD25 y CD69. El patrón de expresión de estas moléculas fue muy similar al que pudo observarse para la expresión de BMPRIA, ya que ésta se encontró asociada prácticamente solo a las células que estaban proliferando y que por lo tanto eran CD25⁺CD69⁺. En correlación con la presencia de BMPRIA, la expresión de la forma activa de Smad-1/5/8 se observó igualmente solo en las células que se habían dividido. Estos resultados parecen indicar que la activación de la vía canónica de señalización BMP en las células T, que presumiblemente se produciría en respuesta a las proteínas BMP producidas por las mDCs, podría estar mediando en su capacidad proliferativa.

Un gran número de trabajos han demostrado que los ligandos BMP son capaces de modular la proliferación de un considerable número de tipos celulares hematopoyéticos como son timocitos⁷⁵⁻⁷⁷, linfocitos B^{86,89}, células madre hematopoyéticas³³²⁻³³⁴, macrófagos⁹³ y, como se ha dicho anteriormente, linfocitos T maduros^{81-83,85}. Esta relación entre el ciclo celular y las proteínas BMP se estudió en más profundidad en nuestro sistema mediante el fenotipado de las células T en función de la fase del ciclo celular en que se encontraban. Según estos resultados, la expresión de BMPRIA parece suponer una ventaja para los linfocitos T en términos de entrada en

ciclo celular, siendo mayor esta ventaja en los primeros momentos de la interacción mDC-linfocito T. Aunque las células BMPRIA⁺ ciclan más que las BMPRIA⁻ en todo momento, esta diferencia se va perdiendo conforme el co-cultivo avanza en el tiempo. Más en detalle, las células en ciclo pasan de ser mayoritariamente CD25⁻BMPRIA⁺ al comienzo del co-cultivo, a ser CD25⁺BMPRIA⁺ y CD25⁺BMPRIA⁻ en igual proporción a los 4 días, para terminar a los 6 días con un fenotipo mayoritario CD25⁺BMPRIA⁻. Por lo tanto, se podría conjeturar que al primer contacto con las mDCs, aquellas células T que expresan BMPRIA a consecuencia de la activación del TCR podrían responder a las BMPs secretadas por las mDCs cuya función sería la de promover la entrada en ciclo celular. En momentos más tardíos de esta interacción, la entrada en juego de mecanismos más potentes como el tándem IL-2/CD25 podría hacer menos evidente la acción de las BMPs.

Como se ha visto al comienzo de este apartado, el tratamiento con BMP-4 incrementa considerablemente la expresión de *ID1* e *ID3* en los linfocitos T activados. Las proteínas ID y, especialmente, ID1 e ID3 han sido ampliamente asociadas a la regulación positiva de la proliferación en distintos tipos celulares y, sobre todo, en procesos cancerosos. Así, la expresión de ID3 parece promover la proliferación de líneas celulares y primarias de cáncer de pulmón^{208,335}, cáncer de pecho³³⁶ y de ovario³³⁷, al igual que en fibroblastos dérmicos humanos³³⁸, entre otros tipos celulares. Igualmente extensa es la bibliografía que demuestra un papel promotor de la proliferación para ID1, como por ejemplo en células de cáncer de colon³³⁹, de próstata³⁴⁰ y de glándula salival³⁴¹. Según está descrito, ID1 e ID3 median su efecto positivo sobre la proliferación celular reduciendo los niveles de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclina p21^{cip1} y p27^{kip1} respectivamente, lo cual bloquea principalmente la transición de la fase G₁ a la fase S del ciclo celular^{338,341}. En relación con el desarrollo de los linfocitos T, las proteínas ID participan de forma activa en momentos clave de la hematopoyesis intratímica³⁴² y su expresión inducida por activación de ambos complejos pre-TCR y TCR se asocia a un incremento en la proliferación y supervivencia tanto de timocitos como de linfocitos T CD4⁺ maduros³⁴³. Siguiendo esta línea de argumentos, sería lógico pensar que la captación de los ligandos BMP producidos por las mDCs daría lugar a un incremento en los niveles de ID1 e ID3 en los linfocitos T CD4⁺. Consecuentemente, esta mayor expresión de proteínas ID estaría promoviendo la entrada en la fase S del ciclo celular que puede observarse en las

células T BMPRIA⁺, posiblemente a causa de una disminución en los niveles de los inhibidores p27^{kip1} y p21^{cip1}. Sin embargo, ésta es tan solo una hipótesis cuya confirmación requerirá la realización de futuros experimentos.

Una forma de abordar la cuestión sobre cuál sería el posible papel de la vía de señalización BMP en la comunicación entre mDCs y linfocitos T CD4⁺ vírgenes es el empleo de inhibidores específicos de esta vía desde el inicio de este contacto. Durante la realización de esta tesis doctoral tuvo lugar la publicación y posterior comercialización de un compuesto inhibidor análogo de la dorsomorfina, denominado DMH1, con una demostrada mayor eficacia que su predecesor en el bloqueo de la vía canónica de señalización BMP⁷⁰. Los resultados obtenidos mediante este acercamiento, usando el nuevo inhibidor, muestran que la presencia de DMH1 durante la interacción mDC-linfocito T bloquea drásticamente la entrada en ciclo celular de los linfocitos T en respuesta al contacto con las mDCs reduciendo, por lo tanto, el porcentaje de células en fase S + G₂ + M. Es más, el análisis de la respuesta proliferativa por pérdida de CFSE nos permitió observar no solo una disminución del porcentaje total de células que se han dividido a lo largo de 4 días de co-cultivo, sino que también se redujo el número de ciclos que experimentaban aquellas células que llegaban a dividirse. Este efecto sobre la proliferación, observado también a los 6 días de co-cultivo aunque de menor magnitud, supone una prueba más que apoya la idea de que la vía de señalización BMP podría ser esencial para la entrada en ciclo celular de las células T. Igualmente, el tratamiento con DMH1 también afecta al porcentaje de células positivas para los marcadores de activación CD25 y CD69, si bien es cierto que la expresión de estas moléculas se encuentra fuertemente asociada a la respuesta proliferativa.

Estos resultados están en línea con los obtenidos en linfocitos T CD4⁺ de ratón por Yoshioka y colaboradores⁸⁵, que muestran un efecto negativo del tratamiento con DM sobre la proliferación de las células T, afectando también al número de divisiones que éstas experimentan. Además del efecto de la DM sobre la proliferación, los autores de este estudio muestran también un bloqueo en la producción de IL-2 en respuesta a la estimulación, y sugieren que la IL-2 podría ser regulada directamente por las proteínas BMP de forma Smad-1/5/8 dependiente y gracias a la activación del factor de transcripción Runx1. Nuestras observaciones apoyan esta teoría pues la presencia de DMH1 en los co-cultivos mDC-linfocito T bloquea casi por completo la producción de

IL-2. Sin embargo, este efecto fue observado principalmente a los dos días de cultivo puesto que los niveles de IL-2 en los co-cultivos tratados con DMH1 se recuperaron a lo largo del tiempo llegando incluso a superar a los del control, invirtiéndose así el efecto, con la dosis más baja ensayada. La cadena α del receptor de alta afinidad para IL-2 (CD25) es el único componente de este complejo cuya expresión es inexistente en linfocitos T CD4⁺ vírgenes en reposo, pero que al igual que el resto de componentes se induce rápidamente en respuesta a diferentes factores³⁴⁴. Uno de estos factores es la propia IL-2, cuya señalización induce la expresión de *CD25/IL2RA*. De forma que en los primeros momentos de activación de los linfocitos T, la IL-2 secretada al medio señala a través de los componentes de menor afinidad de IL-2R participando en la transcripción de *CD25/IL2RA* que, una vez expresado en membrana, al activarse por unión a su ligando promueve la transcripción de *IL2*, creándose así un bucle de retroalimentación positiva que amplifica la señal IL-2/IL-2R^{345,346}. La DMH1, por lo tanto, podría estar afectando a esa primera oleada de producción de IL-2, como puede observarse a los 2 días. Aquellas células que escapan a la inhibición por DMH1 podrían producir IL-2 hasta alcanzar el umbral necesario para la puesta en marcha del bucle IL-2/IL-2R recuperándose así, aunque de forma desfasada, la producción de IL-2 y, consecuentemente, la proliferación de los linfocitos T.

Los resultados aquí discutidos parecen indicar un papel crucial de la vía canónica de señalización BMP en la activación de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes a cargo de las DCs. Si bien es cierto que se podría plantear que el efecto observado por la presencia de DMH1 en los co-cultivos podría deberse a alteraciones en las DCs a causa del tratamiento, resultados de este trabajo no parecen apoyar este supuesto. Como se ha descrito anteriormente, el bloqueo de la vía canónica de señalización BMP en DCs previamente maduras afecta principalmente al mantenimiento en la expresión de PD-L1 y PD-L2. Lo esperable sería que una bajada en los niveles de expresión de los PD-Ls tuviese un efecto positivo sobre la proliferación de células T alogénicas y, sin embargo, la presencia de DMH1 en los co-cultivos tiene justo el efecto contrario. Es más, la estimulación de la vía de señalización BMP en las células T activadas vía TCR resulta en el incremento de la respuesta proliferativa de estas células, lo cual es coherente con el efecto negativo inducido por el inhibidor DMH1. Por lo tanto, aunque no podemos obviar que la DMH1 afecte de algún modo a las DCs, sí podemos decir que los

resultados obtenidos en los co-cultivos mDC-linfocito T se deban principalmente al efecto del tratamiento sobre las células T.

De esta forma, este estudio implica por primera vez a la vía de señalización BMP en la comunicación entre DCs y células T. Concretamente, la vía canónica de señalización BMP estaría promoviendo la más temprana respuesta proliferativa de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes inducida por la activación del TCR y regularía de alguna forma la adquisición de características efectoras en estas células como son la producción de las citoquinas IL-2 e IFN γ y la expresión de CD25 y CD69. En el futuro, nuestros esfuerzos irán enfocados a desvelar los mecanismos subyacentes a estas observaciones que podrían ser de importancia para una mejor comprensión de la interacción DC-célula T en la inducción de la inmunidad adaptativa y la tolerancia central.

CONCLUSIONES

Del conjunto de los resultados obtenidos en este trabajo podemos inferir las siguientes conclusiones:

1. Tanto las DCs inmaduras como las maduras expresan toda la maquinaria necesaria para responder a la estimulación con ligandos BMP activando principalmente la vía canónica.
2. La estimulación de la vía BMP induce en las DCs inmaduras un aumento en su supervivencia, así como la adquisición de características típicas de células maduras.
3. La vía canónica de señalización BMP se activa de forma autocrina/paracrina en las DCs en respuesta a la estimulación con citoquinas pro-inflamatorias.
4. La secreción al medio de BMP-4 por las DCs es inducida por un gran número de estímulos madurativos.
5. El bloqueo de la vía BMP canónica durante la maduración de las DCs, tanto derivadas de monocitos como convencionales, impide la correcta expresión de PD-L1 y PD-L2 sin afectar al resto de características maduras analizadas.
6. IRF1 es un gen diana de la vía BMP canónica y participa en la inducción de PD-L1 y PD-L2 durante la maduración de las DCs.
7. La activación vía TCR de los linfocitos T CD4⁺ vírgenes confiere a estas células la capacidad de responder a ligandos BMP.
8. La vía canónica de señalización BMP se induce en linfocitos T CD4⁺ vírgenes a consecuencia de su interacción con DCs maduras y regula positivamente la respuesta proliferativa y la producción de citoquinas por estas células durante su activación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bragdon, B., Moseychuk, O., Saldanha, S., King, D., Julian, J. & Nohe, A. *Bone morphogenetic proteins: a critical review. Cell Signal* 23, 609-620 (2011).
2. Urist, M.R. *Bone: formation by autoinduction. Science* 150, 893-899 (1965).
3. Wozney, J.M., Rosen, V., Celeste, A.J., Mitscock, L.M., Whitters, M.J., Kriz, R.W., Hewick, R.M. & Wang, E.A. *Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. Science* 242, 1528-1534 (1988).
4. Massague, J. & Chen, Y.G. *Controlling TGF-beta signaling. Genes Dev* 14, 627-644 (2000).
5. Miyazono, K., Kamiya, Y. & Morikawa, M. *Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. J Biochem* 147, 35-51 (2010).
6. Miyazono, K., Maeda, S. & Imamura, T. *BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. Cytokine Growth Factor Rev* 16, 251-263 (2005).
7. Reddi, A.H. *BMPs: from bone morphogenetic proteins to body morphogenetic proteins. Cytokine Growth Factor Rev* 16, 249-250 (2005).
8. Sampath, T.K., Coughlin, J.E., Whetstone, R.M., Banach, D., Corbett, C., Ridge, R.J., Ozkaynak, E., Oppermann, H. & Rueger, D.C. *Bovine osteogenic protein is composed of dimers of OP-1 and BMP-2A, two members of the transforming growth factor-beta superfamily. J Biol Chem* 265, 13198-13205 (1990).
9. Valera, E., Isaacs, M.J., Kawakami, Y., Izpisua Belmonte, J.C. & Choe, S. *BMP-2/6 heterodimer is more effective than BMP-2 or BMP-6 homodimers as inductor of differentiation of human embryonic stem cells. PLoS One* 5, e11167 (2010).
10. Guo, J. & Wu, G. *The signaling and functions of heterodimeric bone morphogenetic proteins. Cytokine Growth Factor Rev* 23, 61-67 (2012).
11. Sieber, C., Kopf, J., Hiepen, C. & Knaus, P. *Recent advances in BMP receptor signaling. Cytokine Growth Factor Rev* 20, 343-355 (2009).
12. Derynck, R. & Zhang, Y.E. *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. Nature* 425, 577-584 (2003).
13. ten Dijke, P., Yamashita, H., Sampath, T.K., Reddi, A.H., Estevez, M., Riddle, D.L., Ichijo, H., Heldin, C.H. & Miyazono, K. *Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4. J Biol Chem* 269, 16985-16988 (1994).
14. Nishitoh, H., Ichijo, H., Kimura, M., Matsumoto, T., Makishima, F., Yamaguchi, A., Yamashita, H., Enomoto, S. & Miyazono, K. *Identification of type I and type II serine/threonine kinase receptors for growth/differentiation factor-5. J Biol Chem* 271, 21345-21352 (1996).
15. Brown, M.A., Zhao, Q., Baker, K.A., Naik, C., Chen, C., Pukac, L., Singh, M., Tsareva, T., Parice, Y., Mahoney, A., Roschke, V., Sanyal, I. & Choe, S. *Crystal structure of BMP-9 and functional interactions with pro-region and receptors. J Biol Chem* 280, 25111-25118 (2005).
16. David, L., Mallet, C., Mazerbourg, S., Feige, J.J. & Bailly, S. *Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. Blood* 109, 1953-1961 (2007).
17. Scharpfenecker, M., van Dinther, M., Liu, Z., van Bezooijen, R.L., Zhao, Q., Pukac, L., Lowik, C.W. & ten Dijke, P. *BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. J Cell Sci* 120, 964-972 (2007).
18. Wu, G., Chen, Y.G., Ozdamar, B., Gyuricza, C.A., Chong, P.A., Wrana, J.L., Massague, J. & Shi, Y. *Structural basis of Smad2 recognition by the Smad anchor for receptor activation. Science* 287, 92-97 (2000).
19. Hollnagel, A., Oehlmann, V., Heymer, J., Ruther, U. & Nordheim, A. *Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. J Biol Chem* 274, 19838-19845 (1999).
20. Miyazono, K. & Miyazawa, K. *Id: a target of BMP signaling. Sci STKE* 2002, pe40 (2002).
21. Ito, Y. & Miyazono, K. *RUNX transcription factors as key targets of TGF-beta superfamily signaling. Curr Opin Genet Dev* 13, 43-47 (2003).
22. Leboy, P., Grasso-Knight, G., D'Angelo, M., Volk, S.W., Lian, J.V., Drissi, H., Stein, G.S. & Adams, S.L. *Smad-Runx interactions during chondrocyte maturation. J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1, S15-22 (2001).
23. Ishida, W., Hamamoto, T., Kusanagi, K., Yagi, K., Kawabata, M., Takehara, K., Sampath, T.K., Kato, M. & Miyazono, K. *Smad6 is a Smad1/5-induced smad inhibitor. Characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter. J Biol Chem* 275, 6075-6079 (2000).
24. Karaulanov, E., Knochel, W. & Niehrs, C. *Transcriptional regulation of BMP4 synexpression in transgenic Xenopus. EMBO J* 23, 844-856 (2004).

25. Kurozumi, K., Nishita, M., Yamaguchi, K., Fujita, T., Ueno, N. & Shibuya, H. *BRAM1, a BMP receptor-associated molecule involved in BMP signalling. Genes Cells* 3, 257-264 (1998).
26. Lu, M., Lin, S.C., Huang, Y., Kang, Y.J., Rich, R., Lo, Y.C., Myszk, D., Han, J. & Wu, H. *XIAP induces NF-kappaB activation via the BIR1/TAB1 interaction and BIR1 dimerization. Mol Cell* 26, 689-702 (2007).
27. Yamaguchi, K., Nagai, S., Ninomiya-Tsuji, J., Nishita, M., Tamai, K., Irie, K., Ueno, N., Nishida, E., Shibuya, H. & Matsumoto, K. *XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. EMBO J* 18, 179-187 (1999).
28. Shibuya, H., Iwata, H., Masuyama, N., Gotoh, Y., Yamaguchi, K., Irie, K., Matsumoto, K., Nishida, E. & Ueno, N. *Role of TAK1 and TAB1 in BMP signaling in early Xenopus development. EMBO J* 17, 1019-1028 (1998).
29. Shim, J.H., Greenblatt, M.B., Xie, M., Schneider, M.D., Zou, W., Zhai, B., Gygi, S. & Glimcher, L.H. *TAK1 is an essential regulator of BMP signalling in cartilage. EMBO J* 28, 2028-2041 (2009).
30. Lee, Y.S. & Chuong, C.M. *Activation of protein kinase A is a pivotal step involved in both BMP-2- and cyclic AMP-induced chondrogenesis. J Cell Physiol* 170, 153-165 (1997).
31. Lemonnier, J., Ghayor, C., Guicheux, J. & Caverzasio, J. *Protein kinase C-independent activation of protein kinase D is involved in BMP-2-induced activation of stress mitogen-activated protein kinases JNK and p38 and osteoblastic cell differentiation. J Biol Chem* 279, 259-264 (2004).
32. Sugimori, K., Matsui, K., Motomura, H., Tokoro, T., Wang, J., Higa, S., Kimura, T. & Kitajima, I. *BMP-2 prevents apoptosis of the N1511 chondrocytic cell line through PI3K/Akt-mediated NF-kappaB activation. J Bone Miner Metab* 23, 411-419 (2005).
33. Perron, J.C. & Dodd, J. *ActRIIA and BMPRII Type II BMP receptor subunits selectively required for Smad4-independent BMP7-evoked chemotaxis. PLoS One* 4, e8198 (2009).
34. Perron, J.C. & Dodd, J. *Inductive specification and axonal orientation of spinal neurons mediated by divergent bone morphogenetic protein signaling pathways. Neural Dev* 6, 36 (2011).
35. Hartung, A., Bitton-Worms, K., Rechtman, M.M., Wenzel, V., Boergemann, J.H., Hassel, S., Henis, Y.I. & Knaus, P. *Different routes of bone morphogenic protein (BMP) receptor endocytosis influence BMP signaling. Mol Cell Biol* 26, 7791-7805 (2006).
36. Hassel, S., Schmitt, S., Hartung, A., Roth, M., Nohe, A., Petersen, N., Ehrlich, M., Henis, Y.I., Sebald, W. & Knaus, P. *Initiation of Smad-dependent and Smad-independent signaling via distinct BMP-receptor complexes. J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 3, 44-51 (2003).
37. Nohe, A., Hassel, S., Ehrlich, M., Neubauer, F., Sebald, W., Henis, Y.I. & Knaus, P. *The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. J Biol Chem* 277, 5330-5338 (2002).
38. Balemans, W. & Van Hul, W. *Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. Dev Biol* 250, 231-250 (2002).
39. Gazzo, E. & Canalis, E. *Bone morphogenetic proteins and their antagonists. Rev Endocr Metab Disord* 7, 51-65 (2006).
40. Walsh, D.W., Godson, C., Brazil, D.P. & Martin, F. *Extracellular BMP-antagonist regulation in development and disease: tied up in knots. Trends Cell Biol* 20, 244-256 (2010).
41. Yanagita, M. *BMP antagonists: their roles in development and involvement in pathophysiology. Cytokine Growth Factor Rev* 16, 309-317 (2005).
42. Zimmerman, L.B., De Jesus-Escobar, J.M. & Harland, R.M. *The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. Cell* 86, 599-606 (1996).
43. Groppe, J., Greenwald, J., Wiater, E., Rodriguez-Leon, J., Economides, A.N., Kwiatkowski, W., Affolter, M., Vale, W.W., Izpisua Belmonte, J.C. & Choe, S. *Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. Nature* 420, 636-642 (2002).
44. Rifas, L. *The role of noggin in human mesenchymal stem cell differentiation. J Cell Biochem* 100, 824-834 (2007).
45. Wu, Q., Sun, C.C., Lin, H.Y. & Babitt, J.L. *Repulsive guidance molecule (RGM) family proteins exhibit differential binding kinetics for bone morphogenetic proteins (BMPs). PLoS One* 7, e46307 (2012).
46. Barbara, N.P., Wrana, J.L. & Letarte, M. *Endoglin is an accessory protein that interacts with the signaling receptor complex of multiple members of the transforming growth factor-beta superfamily. J Biol Chem* 274, 584-594 (1999).

47. Kirkbride, K.C., Townsend, T.A., Bruinsma, M.W., Barnett, J.V. & Blobe, G.C. *Bone morphogenetic proteins signal through the transforming growth factor-beta type III receptor*. *J Biol Chem* 283, 7628-7637 (2008).
48. Onichtchouk, D., Chen, Y.G., Dosch, R., Gawantka, V., Delius, H., Massague, J. & Niehrs, C. *Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI*. *Nature* 401, 480-485 (1999).
49. Jin, W., Yun, C., Kim, H.S. & Kim, S.J. *TrkC binds to the bone morphogenetic protein type II receptor to suppress bone morphogenetic protein signaling*. *Cancer Res* 67, 9869-9877 (2007).
50. Sammar, M., Stricker, S., Schwabe, G.C., Sieber, C., Hartung, A., Hanke, M., Oishi, I., Pohl, J., Minami, Y., Sebald, W., Mundlos, S. & Knaus, P. *Modulation of GDF5/BRI-b signalling through interaction with the tyrosine kinase receptor Ror2*. *Genes Cells* 9, 1227-1238 (2004).
51. Goto, K., Kamiya, Y., Imamura, T., Miyazono, K. & Miyazawa, K. *Selective inhibitory effects of Smad6 on bone morphogenetic protein type I receptors*. *J Biol Chem* 282, 20603-20611 (2007).
52. Mochizuki, T., Miyazaki, H., Hara, T., Furuya, T., Imamura, T., Watabe, T. & Miyazono, K. *Roles for the MH2 domain of Smad7 in the specific inhibition of transforming growth factor-beta superfamily signaling*. *J Biol Chem* 279, 31568-31574 (2004).
53. Murakami, G., Watabe, T., Takaoka, K., Miyazono, K. & Imamura, T. *Cooperative inhibition of bone morphogenetic protein signaling by Smurf1 and inhibitory Smads*. *Mol Biol Cell* 14, 2809-2817 (2003).
54. Zhang, S., Fei, T., Zhang, L., Zhang, R., Chen, F., Ning, Y., Han, Y., Feng, X.H., Meng, A. & Chen, Y.G. *Smad7 antagonizes transforming growth factor beta signaling in the nucleus by interfering with functional Smad-DNA complex formation*. *Mol Cell Biol* 27, 4488-4499 (2007).
55. Zhang, Y., Chang, C., Gehling, D.J., Hemmati-Brivanlou, A. & Derynck, R. *Regulation of Smad degradation and activity by Smurf2, an E3 ubiquitin ligase*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 974-979 (2001).
56. Zhu, H., Kavsak, P., Abdollah, S., Wrana, J.L. & Thomsen, G.H. *A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation*. *Nature* 400, 687-693 (1999).
57. Zhao, G.Q. *Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse*. *Genesis* 35, 43-56 (2003).
58. Hogan, B.L. *Bone morphogenetic proteins in development*. *Curr Opin Genet Dev* 6, 432-438 (1996).
59. Mishina, Y., Suzuki, A., Ueno, N. & Behringer, R.R. *Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis*. *Genes Dev* 9, 3027-3037 (1995).
60. Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P.A. & Hogan, B.L. *Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse*. *Genes Dev* 9, 2105-2116 (1995).
61. Pignolo, R.J., Shore, E.M. & Kaplan, F.S. *Fibrodysplasia ossificans progressiva: diagnosis, management, and therapeutic horizons*. *Pediatr Endocrinol Rev* 10 Suppl 2, 437-448 (2013).
62. Lories, R.J. & Luyten, F.P. *Bone morphogenetic protein signaling and arthritis*. *Cytokine Growth Factor Rev* 20, 467-473 (2009).
63. Voumvourakis, K.I., Antonelou, R., Kitsos, D.K., Stamboulis, E. & Tsiodras, S. *TGF-beta/BMPs: crucial crossroad in neural autoimmune disorders*. *Neurochem Int* 59, 542-550 (2011).
64. Rosendahl, A., Pardali, E., Speletas, M., Ten Dijke, P., Heldin, C.H. & Sideras, P. *Activation of bone morphogenetic protein/Smad signaling in bronchial epithelial cells during airway inflammation*. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27, 160-169 (2002).
65. Cai, J., Pardali, E., Sanchez-Duffhues, G. & ten Dijke, P. *BMP signaling in vascular diseases*. *FEBS Lett* 586, 1993-2002 (2012).
66. Sorescu, G.P., Sykes, M., Weiss, D., Platt, M.O., Saha, A., Hwang, J., Boyd, N., Boo, Y.C., Vega, J.D., Taylor, W.R. & Jo, H. *Bone morphogenetic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress stimulates an inflammatory response*. *J Biol Chem* 278, 31128-31135 (2003).
67. Singh, A. & Morris, R.J. *The Yin and Yang of bone morphogenetic proteins in cancer*. *Cytokine Growth Factor Rev* 21, 299-313 (2010).
68. Yu, P.B., Hong, C.C., Sachidanandan, C., Babitt, J.L., Deng, D.Y., Hoyng, S.A., Lin, H.Y., Bloch, K.D. & Peterson, R.T. *Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism*. *Nat Chem Biol* 4, 33-41 (2008).
69. Cuny, G.D., Yu, P.B., Laha, J.K., Xing, X., Liu, J.F., Lai, C.S., Deng, D.Y., Sachidanandan, C., Bloch, K.D. & Peterson, R.T. *Structure-activity relationship study of bone morphogenetic protein (BMP) signaling inhibitors*. *Bioorg Med Chem Lett* 18, 4388-4392 (2008).

70. Hao, J., Ho, J.N., Lewis, J.A., Karim, K.A., Daniels, R.N., Gentry, P.R., Hopkins, C.R., Lindsley, C.W. & Hong, C.C. *In vivo structure-activity relationship study of dorsomorphin analogues identifies selective VEGF and BMP inhibitors. ACS Chem Biol* 5, 245-253 (2010).
71. Marks-Bluth, J. & Pimanda, J.E. *Cell signalling pathways that mediate haematopoietic stem cell specification. Int J Biochem Cell Biol* 44, 2175-2184 (2012).
72. Marshall, C.J., Kinnon, C. & Thrasher, A.J. *Polarized expression of bone morphogenetic protein-4 in the human aorta-gonad-mesonephros region. Blood* 96, 1591-1593 (2000).
73. Chadwick, K., Wang, L., Li, L., Menendez, P., Murdoch, B., Rouleau, A. & Bhatia, M. *Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. Blood* 102, 906-915 (2003).
74. Marshall, C.J., Sinclair, J.C., Thrasher, A.J. & Kinnon, C. *Bone morphogenetic protein 4 modulates c-Kit expression and differentiation potential in murine embryonic aorta-gonad-mesonephros haematopoiesis in vitro. Br J Haematol* 139, 321-330 (2007).
75. Cejalvo, T., Sacedon, R., Hernandez-Lopez, C., Diez, B., Gutierrez-Frias, C., Valencia, J., Zapata, A.G., Varas, A. & Vicente, A. *Bone morphogenetic protein-2/4 signalling pathway components are expressed in the human thymus and inhibit early T-cell development. Immunology* 121, 94-104 (2007).
76. Graf, D., Nethisinghe, S., Palmer, D.B., Fisher, A.G. & Merckenschlager, M. *The developmentally regulated expression of Twisted gastrulation reveals a role for bone morphogenetic proteins in the control of T cell development. J Exp Med* 196, 163-171 (2002).
77. Hager-Theodorides, A.L., Outram, S.V., Shah, D.K., Sacedon, R., Shrimpton, R.E., Vicente, A., Varas, A. & Crompton, T. *Bone morphogenetic protein 2/4 signaling regulates early thymocyte differentiation. J Immunol* 169, 5496-5504 (2002).
78. Passa, O., Tsalavos, S., Belyaev, N.N., Petryk, A., Potocnik, A.J. & Graf, D. *Compartmentalization of bone morphogenetic proteins and their antagonists in lymphoid progenitors and supporting microenvironments and functional implications. Immunology* 134, 349-359 (2011).
79. Tsai, P.T., Lee, R.A. & Wu, H. *BMP4 acts upstream of FGF in modulating thymic stroma and regulating thymopoiesis. Blood* 102, 3947-3953 (2003).
80. Varas, A., Sacedon, R., Hidalgo, L., Martinez, V.G., Valencia, J., Cejalvo, T., Zapata, A., Hernandez-Lopez, C. & Vicente, A. *Interplay between BMP4 and IL-7 in human intrathymic precursor cells. Cell Cycle* 8, 4119-4126 (2009).
81. Varas A., M.V., Hernández-López C., Hidalgo L., Entrena A., Valencia J., Zapata A., Sacedón R., Vicente A. *Role of BMP signalling in peripheral CD4+ T cell proliferation. Inmunología* 28, 125-130 (2009).
82. Lu, L., Ma, J., Wang, X., Wang, J., Zhang, F., Yu, J., He, G., Xu, B., Brand, D.D., Horwitz, D.A., Shi, W. & Zheng, S.G. *Synergistic effect of TGF-beta superfamily members on the induction of Foxp3+ Treg. Eur J Immunol* 40, 142-152 (2010).
83. Sivertsen, E.A., Huse, K., Hystad, M.E., Kersten, C., Smeland, E.B. & Myklebust, J.H. *Inhibitory effects and target genes of bone morphogenetic protein 6 in Jurkat TAg cells. Eur J Immunol* 37, 2937-2948 (2007).
84. Takai, S., Tokuda, H., Matsushima-Nishiwaki, R., Saio, M., Takami, T. & Kozawa, O. *TGF-beta superfamily enhances the antigen-induced IFN-gamma production by effector/memory CD8+ T cells. Int J Mol Med* 25, 105-111 (2010).
85. Yoshioka, Y., Ono, M., Osaki, M., Konishi, I. & Sakaguchi, S. *Differential effects of inhibition of bone morphogenic protein (BMP) signalling on T-cell activation and differentiation. Eur J Immunol* 42, 749-759 (2012).
86. Kersten, C., Dosen, G., Myklebust, J.H., Sivertsen, E.A., Hystad, M.E., Smeland, E.B. & Rian, E. *BMP-6 inhibits human bone marrow B lymphopoiesis--upregulation of Id1 and Id3. Exp Hematol* 34, 72-81 (2006).
87. Zetterblad, J., Qian, H., Zandi, S., Mansson, R., Lagergren, A., Hansson, F., Bryder, D., Paulsson, N. & Sigvardsson, M. *Genomics based analysis of interactions between developing B-lymphocytes and stromal cells reveal complex interactions and two-way communication. BMC Genomics* 11, 108 (2010).
88. Huse, K., Bakkebo, M., Oksvold, M.P., Forfang, L., Hilden, V.I., Stokke, T., Smeland, E.B. & Myklebust, J.H. *Bone morphogenetic proteins inhibit CD40L/IL-21-induced Ig production in human B cells: differential effects of BMP-6 and BMP-7. Eur J Immunol* 41, 3135-3145 (2011).
89. Kersten, C., Sivertsen, E.A., Hystad, M.E., Forfang, L., Smeland, E.B. & Myklebust, J.H. *BMP-6 inhibits growth of mature human B cells; induction of Smad phosphorylation and upregulation of Id1. BMC Immunol* 6, 9 (2005).

90. Tsalavos, S., Segklia, K., Passa, O., Petryk, A., O'Connor, M.B. & Graf, D. *Involvement of twisted gastrulation in T cell-independent plasma cell production. J Immunol* 186, 6860-6870 (2011).
91. Hidalgo, L., Martinez, V.G., Valencia, J., Hernandez-Lopez, C., Vazquez, M.N., Nunez, J.R., Zapata, A.G., Sacedon, R., Varas, A. & Vicente, A. *Expression of BMPRIA on human thymic NK cell precursors: role of BMP signaling in intrathymic NK cell development. Blood* 119, 1861-1871 (2012).
92. Cunningham, N.S., Paralkar, V. & Reddi, A.H. *Osteogenin and recombinant bone morphogenetic protein 2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor beta 1 mRNA expression. Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11740-11744 (1992).
93. Hong, J.H., Lee, G.T., Lee, J.H., Kwon, S.J., Park, S.H., Kim, S.J. & Kim, I.Y. *Effect of bone morphogenetic protein-6 on macrophages. Immunology* 128, e442-450 (2009).
94. Rocher, C., Singla, R., Singal, P.K., Parthasarathy, S. & Singla, D.K. *Bone morphogenetic protein 7 polarizes THP-1 cells into M2 macrophages. Can J Physiol Pharmacol* 90, 947-951 (2012).
95. Fong, D., Bisson, M., Laberge, G., McManus, S., Grenier, G., Fauchoux, N. & Roux, S. *Bone morphogenetic protein-9 activates Smad and ERK pathways and supports human osteoclast function and survival in vitro. Cell Signal* 25, 717-728 (2013).
96. Maurer, T., Zimmermann, G., Maurer, S., Stegmaier, S., Wagner, C. & Hansch, G.M. *Inhibition of osteoclast generation: a novel function of the bone morphogenetic protein 7/osteogenic protein 1. Mediators Inflamm* 2012, 171209 (2012).
97. Bhat, A., Wooten, R.M. & Jayasuriya, A.C. *Secretion of growth factors from macrophages when cultured with microparticles. J Biomed Mater Res A* 101, 3170-3180 (2013).
98. Chung, J.H., Jeon, H.J., Hong, S.Y., Lee da, L., Lee, K.H., Kim, S.H., Han, Y.S., Manabe, I., Miller, Y.I. & Lee, S.H. *Palmitate promotes the paracrine effects of macrophages on vascular smooth muscle cells: the role of bone morphogenetic proteins. PLoS One* 7, e29100 (2012).
99. Wu, X., Yung, L.M., Cheng, W.H., Yu, P.B., Babitt, J.L., Lin, H.Y. & Xia, Y. *Hepcidin regulation by BMP signaling in macrophages is lipopolysaccharide dependent. PLoS One* 7, e44622 (2012).
100. Xia, Y., Cortez-Retamozo, V., Niederkofler, V., Salie, R., Chen, S., Samad, T.A., Hong, C.C., Arber, S., Vyas, J.M., Weissleder, R., Pittet, M.J. & Lin, H.Y. *Dragon (repulsive guidance molecule b) inhibits IL-6 expression in macrophages. J Immunol* 186, 1369-1376 (2011).
101. Kwon, S.J., Lee, G.T., Lee, J.H., Kim, W.J. & Kim, I.Y. *Bone morphogenetic protein-6 induces the expression of inducible nitric oxide synthase in macrophages. Immunology* 128, e758-765 (2009).
102. Lee, G.T., Jung, Y.S., Lee, J.H., Kim, W.J. & Kim, I.Y. *Bone morphogenetic protein 6-induced interleukin-1beta expression in macrophages requires PU.1/Smad1 interaction. Mol Immunol* 48, 1540-1547 (2011).
103. Lee, G.T., Kwon, S.J., Lee, J.H., Jeon, S.S., Jang, K.T., Choi, H.Y., Lee, H.M., Kim, W.J., Kim, S.J. & Kim, I.Y. *Induction of interleukin-6 expression by bone morphogenetic protein-6 in macrophages requires both SMAD and p38 signaling pathways. J Biol Chem* 285, 39401-39408 (2010).
104. Martinez, V.G., Hernandez-Lopez, C., Valencia, J., Hidalgo, L., Entrena, A., Zapata, A.G., Vicente, A., Sacedon, R. & Varas, A. *The canonical BMP signaling pathway is involved in human monocyte-derived dendritic cell maturation. Immunol Cell Biol* 89, 610-618 (2011).
105. Pluchino, S., Zanutti, L., Brambilla, E., Rovere-Querini, P., Capobianco, A., Alfaro-Cervello, C., Salani, G., Cossetti, C., Borsellino, G., Battistini, L., Ponzoni, M., Doglioni, C., Garcia-Verdugo, J.M., Comi, G., Manfredi, A.A. & Martino, G. *Immune regulatory neural stem/precursor cells protect from central nervous system autoimmunity by restraining dendritic cell function. PLoS One* 4, e5959 (2009).
106. Abhishek, K., Kumar, R., Arif, E., Patra, P.K., Choudhary, S.B. & Sohail, M. *Induced expression of bone morphogenetic protein-6 and Smads signaling in human monocytes derived dendritic cells during sickle-cell pathology with orthopedic complications. Biochem Biophys Res Commun* 396, 950-955 (2010).
107. Steinman, R.M. & Cohn, Z.A. *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. J Exp Med* 137, 1142-1162 (1973).
108. Steinman, R.M. & Cohn, Z.A. *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. J Exp Med* 139, 380-397 (1974).
109. Banchereau, J. & Steinman, R.M. *Dendritic cells and the control of immunity. Nature* 392, 245-252 (1998).

110. Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J. & Mortha, A. *The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. Annu Rev Immunol* 31, 563-604 (2013).
111. Abb, J., Abb, H. & Deinhardt, F. *Phenotype of human alpha-interferon producing leucocytes identified by monoclonal antibodies. Clin Exp Immunol* 52, 179-184 (1983).
112. Trinchieri, G., Santoli, D., Dee, R.R. & Knowles, B.B. *Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Identification of the anti-viral activity as interferon and characterization of the human effector lymphocyte subpopulation. J Exp Med* 147, 1299-1313 (1978).
113. Siegal, F.P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P.A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S. & Liu, Y.J. *The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. Science* 284, 1835-1837 (1999).
114. Cella, M., Jarrossay, D., Facchetti, F., Alebardi, O., Nakajima, H., Lanzavecchia, A. & Colonna, M. *Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. Nat Med* 5, 919-923 (1999).
115. Dzionek, A., Fuchs, A., Schmidt, P., Cremer, S., Zysk, M., Miltenyi, S., Buck, D.W. & Schmitz, J. *BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. J Immunol* 165, 6037-6046 (2000).
116. Reizis, B., Bunin, A., Ghosh, H.S., Lewis, K.L. & Sisirak, V. *Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. Annu Rev Immunol* 29, 163-183 (2011).
117. Hoeffel, G., Ripoche, A.C., Matheoud, D., Nascimbeni, M., Escriou, N., Lebon, P., Heshmati, F., Guillet, J.G., Gannage, M., Caillat-Zucman, S., Casartelli, N., Schwartz, O., De la Salle, H., Hanau, D., Hosmalin, A. & Maranon, C. *Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. Immunity* 27, 481-492 (2007).
118. Liu, C., Lou, Y., Lizée, G., Qin, H., Liu, S., Rabinovich, B., Kim, G.J., Wang, Y.H., Ye, Y., Sikora, A.G., Overwijk, W.W., Liu, Y.J., Wang, G. & Hwu, P. *Plasmacytoid dendritic cells induce NK cell-dependent, tumor antigen-specific T cell cross-priming and tumor regression in mice. J Clin Invest* 118, 1165-1175 (2008).
119. Idoyaga, J., Suda, N., Suda, K., Park, C.G. & Steinman, R.M. *Antibody to Langerin/CD207 localizes large numbers of CD8α⁺ dendritic cells to the marginal zone of mouse spleen. Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1524-1529 (2009).
120. Verstege, M.I., ten Kate, F.J., Reinartz, S.M., van Drunen, C.M., Slors, F.J., Bemelman, W.A., Vyth-Dreese, F.A. & te Velde, A.A. *Dendritic cell populations in colon and mesenteric lymph nodes of patients with Crohn's disease. J Histochem Cytochem* 56, 233-241 (2008).
121. Villadangos, J.A. & Schnorrer, P. *Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. Nat Rev Immunol* 7, 543-555 (2007).
122. Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A. & Amigorena, S. *Cross-presentation by dendritic cells. Nat Rev Immunol* 12, 557-569 (2012).
123. Austyn, J.M., Kupiec-Weglinski, J.W., Hankins, D.F. & Morris, P.J. *Migration patterns of dendritic cells in the mouse. Homing to T cell-dependent areas of spleen, and binding within marginal zone. J Exp Med* 167, 646-651 (1988).
124. Forster, R., Braun, A. & Worbs, T. *Lymph node homing of T cells and dendritic cells via afferent lymphatics. Trends Immunol* 33, 271-280 (2012).
125. Reis e Sousa, C. *Dendritic cells in a mature age. Nat Rev Immunol* 6, 476-483 (2006).
126. Villadangos, J.A. & Heath, W.R. *Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: limitations of the Langerhans cells paradigm. Semin Immunol* 17, 262-272 (2005).
127. O'Doherty, U., Peng, M., Gezelter, S., Swiggard, W.J., Betjes, M., Bhardwaj, N. & Steinman, R.M. *Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. Immunology* 82, 487-493 (1994).
128. Haniffa, M., Shin, A., Bigley, V., McGovern, N., Teo, P., See, P., Wasan, P.S., Wang, X.N., Malinarich, F., Malleret, B., Larbi, A., Tan, P., Zhao, H., Poidinger, M., Pagan, S., Cookson, S., Dickinson, R., Dimmick, I., Jarrett, R.F., Renia, L., Tam, J., Song, C., Connolly, J., Chan, J.K., Gehring, A., Bertoletti, A., Collin, M. & Ginhoux, F. *Human tissues contain CD141^{hi} cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103⁺ nonlymphoid dendritic cells. Immunity* 37, 60-73 (2012).
129. Poulin, L.F., Rey, Y., Uronen-Hansson, H., Schraml, B.U., Sancho, D., Murphy, K.M., Hakansson, U.K., Moita, L.F., Agace, W.W., Bonnet, D. & Reis e Sousa, C. *DNGR-1 is a specific and universal marker of mouse and human Batf3-dependent dendritic cells in lymphoid and nonlymphoid tissues. Blood* 119, 6052-6062 (2012).

130. Zaba, L.C., Fuentes-Duculan, J., Steinman, R.M., Krueger, J.G. & Lowes, M.A. *Normal human dermis contains distinct populations of CD11c+BDCA-1+ dendritic cells and CD163+FXIIIa+ macrophages.* *J Clin Invest* 117, 2517-2525 (2007).
131. Fooksman, D.R., Vardhana, S., Vasiliver-Shamis, G., Liese, J., Blair, D.A., Waite, J., Sacristan, C., Victora, G.D., Zanin-Zhorov, A. & Dustin, M.L. *Functional anatomy of T cell activation and synapse formation.* *Annu Rev Immunol* 28, 79-105 (2010).
132. Johnson, J.G. & Jenkins, M.K. *Accessory cell-derived signals required for T cell activation.* *Immunol Res* 12, 48-64 (1993).
133. Curtsinger, J.M., Schmidt, C.S., Mondino, A., Lins, D.C., Kedl, R.M., Jenkins, M.K. & Mescher, M.F. *Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells.* *J Immunol* 162, 3256-3262 (1999).
134. Byrne, J.A., Butler, J.L. & Cooper, M.D. *Differential activation requirements for virgin and memory T cells.* *J Immunol* 141, 3249-3257 (1988).
135. Croft, M., Bradley, L.M. & Swain, S.L. *Naive versus memory CD4 T cell response to antigen. Memory cells are less dependent on accessory cell costimulation and can respond to many antigen-presenting cell types including resting B cells.* *J Immunol* 152, 2675-2685 (1994).
136. Kinnear, G., Jones, N.D. & Wood, K.J. *Costimulation blockade: current perspectives and implications for therapy.* *Transplantation* 95, 527-535 (2013).
137. Lenschow, D.J., Walunas, T.L. & Bluestone, J.A. *CD28/B7 system of T cell costimulation.* *Annu Rev Immunol* 14, 233-258 (1996).
138. Boise, L.H., Minn, A.J., Noel, P.J., June, C.H., Accavitti, M.A., Lindsten, T. & Thompson, C.B. *CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL.* *Immunity* 3, 87-98 (1995).
139. Linsley, P.S., Brady, W., Grosmaire, L., Aruffo, A., Damle, N.K. & Ledbetter, J.A. *Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation.* *J Exp Med* 173, 721-730 (1991).
140. Semple, K., Nguyen, A., Yu, Y., Wang, H., Anasetti, C. & Yu, X.Z. *Strong CD28 costimulation suppresses induction of regulatory T cells from naive precursors through Lck signaling.* *Blood* 117, 3096-3103 (2011).
141. Peach, R.J., Bajorath, J., Brady, W., Leytze, G., Greene, J., Naemura, J. & Linsley, P.S. *Complementarity determining region 1 (CDR1)- and CDR3-analogous regions in CTLA-4 and CD28 determine the binding to B7-1.* *J Exp Med* 180, 2049-2058 (1994).
142. Brunner, M.C., Chambers, C.A., Chan, F.K., Hanke, J., Winoto, A. & Allison, J.P. *CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation.* *J Immunol* 162, 5813-5820 (1999).
143. Walunas, T.L., Bakker, C.Y. & Bluestone, J.A. *CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation.* *J Exp Med* 183, 2541-2550 (1996).
144. Keir, M.E., Francisco, L.M. & Sharpe, A.H. *PD-1 and its ligands in T-cell immunity.* *Curr Opin Immunol* 19, 309-314 (2007).
145. Riella, L.V., Paterson, A.M., Sharpe, A.H. & Chandraker, A. *Role of the PD-1 pathway in the immune response.* *Am J Transplant* 12, 2575-2587 (2012).
146. Yamazaki, T., Akiba, H., Iwai, H., Matsuda, H., Aoki, M., Tanno, Y., Shin, T., Tsuchiya, H., Pardoll, D.M., Okumura, K., Azuma, M. & Yagita, H. *Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC.* *J Immunol* 169, 5538-5545 (2002).
147. Chen, C., Qu, Q.X., Huang, J.A., Zhu, Y.B., Ge, Y., Wang, Q. & Zhang, X.G. *Expression of programmed-death receptor ligands 1 and 2 may contribute to the poor stimulatory potential of murine immature dendritic cells.* *Immunobiology* 212, 159-165 (2007).
148. Karakhanova, S., Meisel, S., Ring, S., Mahnke, K. & Enk, A.H. *ERK/p38 MAP-kinases and PI3K are involved in the differential regulation of B7-H1 expression in DC subsets.* *Eur J Immunol* 40, 254-266 (2010).
149. Kim, H.K., Guan, H., Zu, G., Li, H., Wu, L., Feng, X., Elmetts, C., Fu, Y. & Xu, H. *High-level expression of B7-H1 molecules by dendritic cells suppresses the function of activated T cells and desensitizes allergen-primed animals.* *J Leukoc Biol* 79, 686-695 (2006).
150. Sheppard, K.A., Fitz, L.J., Lee, J.M., Benander, C., George, J.A., Wooters, J., Qiu, Y., Jussif, J.M., Carter, L.L., Wood, C.R. & Chaudhary, D. *PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKCtheta.* *FEBS Lett* 574, 37-41 (2004).
151. Latchman, Y., Wood, C.R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., Iwai, Y., Long, A.J., Brown, J.A., Nunes, R., Greenfield, E.A., Bourque, K., Boussiotis, V.A., Carter, L.L., Carreno, B.M., Malenkovich, N., Nishimura, H., Okazaki, T., Honjo, T., Sharpe, A.H. &

- Freeman, G.J. *PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation*. *Nat Immunol* 2, 261-268 (2001).
152. Ma, D.Y. & Clark, E.A. *The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells*. *Semin Immunol* 21, 265-272 (2009).
153. Banchereau, J., Bazan, F., Blanchard, D., Briere, F., Galizzi, J.P., van Kooten, C., Liu, Y.J., Rousset, F. & Saeland, S. *The CD40 antigen and its ligand*. *Annu Rev Immunol* 12, 881-922 (1994).
154. Boisvert, J., Edmondson, S. & Krummel, M.F. *Immunological synapse formation licenses CD40-CD40L accumulations at T-APC contact sites*. *J Immunol* 173, 3647-3652 (2004).
155. Leitner, J., Grabmeier-Pfistershammer, K. & Steinberger, P. *Receptors and ligands implicated in human T cell costimulatory processes*. *Immunol Lett* 128, 89-97 (2010).
156. Peters, J.H., Xu, H., Ruppert, J., Ostermeier, D., Friedrichs, D. & Gieseler, R.K. *Signals required for differentiating dendritic cells from human monocytes in vitro*. *Adv Exp Med Biol* 329, 275-280 (1993).
157. Dominguez, P.M. & Ardavin, C. *Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation*. *Immunol Rev* 234, 90-104 (2010).
158. Grabbe, S., Beissert, S., Schwarz, T. & Granstein, R.D. *Dendritic cells as initiators of tumor immune responses: a possible strategy for tumor immunotherapy?* *Immunol Today* 16, 117-121 (1995).
159. Palucka, K. & Banchereau, J. *Dendritic-cell-based therapeutic cancer vaccines*. *Immunity* 39, 38-48 (2013).
160. Bronte, V. & Mocellin, S. *Suppressive influences in the immune response to cancer*. *J Immunother* 32, 1-11 (2009).
161. Liechtenstein, T., Dufait, I., Lanna, A., Breckpot, K. & Escors, D. *Modulating Co-Stimulation during Antigen Presentation to Enhance Cancer Immunotherapy*. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem* 12, 224-235 (2012).
162. Sabado, R.L. & Bhardwaj, N. *Directing dendritic cell immunotherapy towards successful cancer treatment*. *Immunotherapy* 2, 37-56 (2010).
163. Shen, L., Evel-Kabler, K., Strube, R. & Chen, S.Y. *Silencing of SOCS1 enhances antigen presentation by dendritic cells and antigen-specific anti-tumor immunity*. *Nat Biotechnol* 22, 1546-1553 (2004).
164. Sioud, M., Saeboe-Larssen, S., Hetland, T.E., Kaern, J., Mobergslien, A. & Kvalheim, G. *Silencing of indoleamine 2,3-dioxygenase enhances dendritic cell immunogenicity and antitumour immunity in cancer patients*. *Int J Oncol* 43, 280-288 (2013).
165. Rosenblatt, J., Glotzbecker, B., Mills, H., Vasir, B., Tzachanis, D., Levine, J.D., Joyce, R.M., Wellenstein, K., Keefe, W., Schickler, M., Rotem-Yehudar, R., Kufe, D. & Avigan, D. *PD-1 blockade by CT-011, anti-PD-1 antibody, enhances ex vivo T-cell responses to autologous dendritic cell/myeloma fusion vaccine*. *J Immunother* 34, 409-418 (2011).
166. Ribas, A., Comin-Anduix, B., Chmielowski, B., Jalil, J., de la Rocha, P., McCannel, T.A., Ochoa, M.T., Seja, E., Villanueva, A., Oseguera, D.K., Straatsma, B.R., Cochran, A.J., Glaspy, J.A., Hui, L., Marincola, F.M., Wang, E., Economou, J.S. & Gomez-Navarro, J. *Dendritic cell vaccination combined with CTLA4 blockade in patients with metastatic melanoma*. *Clin Cancer Res* 15, 6267-6276 (2009).
167. Boudreau, J.E., Bonehill, A., Thielemans, K. & Wan, Y. *Engineering dendritic cells to enhance cancer immunotherapy*. *Mol Ther* 19, 841-853 (2011).
168. Pruitt, S.K., Boczkowski, D., de Rosa, N., Haley, N.R., Morse, M.A., Tyler, D.S., Dannull, J. & Nair, S. *Enhancement of anti-tumor immunity through local modulation of CTLA-4 and GITR by dendritic cells*. *Eur J Immunol* 41, 3553-3563 (2011).
169. Hobo, W., Novobrantseva, T.I., Fredrix, H., Wong, J., Milstein, S., Epstein-Barash, H., Liu, J., Schaap, N., van der Voort, R. & Dolstra, H. *Improving dendritic cell vaccine immunogenicity by silencing PD-1 ligands using siRNA-lipid nanoparticles combined with antigen mRNA electroporation*. *Cancer Immunol Immunother* 62, 285-297 (2013).
170. Lion, E., Smits, E.L., Berneman, Z.N. & Van Tendeloo, V.F. *NK cells: key to success of DC-based cancer vaccines?* *Oncologist* 17, 1256-1270 (2012).
171. Hernandez-Lopez, C., Valencia, J., Hidalgo, L., Martinez, V.G., Zapata, A.G., Sacedon, R., Varas, A. & Vicente, A. *CXCL12/CXCR4 signaling promotes human thymic dendritic cell survival regulating the Bcl-2/Bax ratio*. *Immunol Lett* 120, 72-78 (2008).
172. Mattioli, B., Giordani, L., Quaranta, M.G. & Viora, M. *Leptin exerts an anti-apoptotic effect on human dendritic cells via the PI3K-Akt signaling pathway*. *FEBS Lett* 583, 1102-1106 (2009).

173. Nopora, A. & Brocker, T. *Bcl-2 controls dendritic cell longevity in vivo*. *J Immunol* 169, 3006-3014 (2002).
174. Zaidi, S.K., Sullivan, A.J., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Stein, G.S. & Lian, J.B. *Integration of Runx and Smad regulatory signals at transcriptionally active subnuclear sites*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 8048-8053 (2002).
175. Dominguez-Soto, A., Relloso, M., Vega, M.A., Corbi, A.L. & Puig-Kroger, A. *RUNX3 regulates the activity of the CD11a and CD49d integrin gene promoters*. *Immunobiology* 210, 133-139 (2005).
176. Fainaru, O., Shseyov, D., Hantisteanu, S. & Groner, Y. *Accelerated chemokine receptor 7-mediated dendritic cell migration in Runx3 knockout mice and the spontaneous development of asthma-like disease*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10598-10603 (2005).
177. Fainaru, O., Woolf, E., Lotem, J., Yarmus, M., Brenner, O., Goldenberg, D., Negreanu, V., Bernstein, Y., Levanon, D., Jung, S. & Groner, Y. *Runx3 regulates mouse TGF-beta-mediated dendritic cell function and its absence results in airway inflammation*. *EMBO J* 23, 969-979 (2004).
178. Puig-Kroger, A., Aguilera-Montilla, N., Martinez-Nunez, R., Dominguez-Soto, A., Sanchez-Cabo, F., Martin-Gayo, E., Zaballós, A., Toribio, M.L., Groner, Y., Ito, Y., Dopazo, A., Corcuera, M.T., Alonso Martin, M.J., Vega, M.A. & Corbi, A.L. *The novel RUNX3/p33 isoform is induced upon monocyte-derived dendritic cell maturation and downregulates IL-8 expression*. *Immunobiology* 215, 812-820 (2010).
179. Arikawa, T., Omura, K. & Morita, I. *Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression by endogenous prostaglandin E2 in human mesenchymal stem cells*. *J Cell Physiol* 200, 400-406 (2004).
180. Fukui, N., Zhu, Y., Maloney, W.J., Clohisy, J. & Sandell, L.J. *Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes*. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 3, 59-66 (2003).
181. Horiguchi, M., Akiyama, H., Ito, H., Shigeno, C. & Nakamura, T. *Tumour necrosis factor-alpha up-regulates the expression of BMP-4 mRNA but inhibits chondrogenesis in mouse clonal chondrogenic EC cells, ATDC5*. *Cytokine* 12, 526-530 (2000).
182. Belz, G.T. & Nutt, S.L. *Transcriptional programming of the dendritic cell network*. *Nat Rev Immunol* 12, 101-113 (2012).
183. Hacker, C., Kirsch, R.D., Ju, X.S., Hieronymus, T., Gust, T.C., Kuhl, C., Jorgas, T., Kurz, S.M., Rose-John, S., Yokota, Y. & Zenke, M. *Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development*. *Nat Immunol* 4, 380-386 (2003).
184. Rankin, L. & Belz, G.T. *Diverse roles of inhibitor of differentiation 2 in adaptive immunity*. *Clin Dev Immunol* 2011, 281569 (2011).
185. Marcenaro, E., Carlomagno, S., Pesce, S., Moretta, A. & Sivori, S. *NK/DC crosstalk in anti-viral response*. *Adv Exp Med Biol* 946, 295-308 (2012).
186. Gabriele, L. & Ozato, K. *The role of the interferon regulatory factor (IRF) family in dendritic cell development and function*. *Cytokine Growth Factor Rev* 18, 503-510 (2007).
187. Tailor, P., Tamura, T. & Ozato, K. *IRF family proteins and type I interferon induction in dendritic cells*. *Cell Res* 16, 134-140 (2006).
188. Hu, Y., Park-Min, K.H., Yamilina, A. & Ivashkiv, L.B. *Regulation of STAT pathways and IRF1 during human dendritic cell maturation by TNF-alpha and PGE2*. *J Leukoc Biol* 84, 1353-1360 (2008).
189. Lee, S.J., Jang, B.C., Lee, S.W., Yang, Y.I., Suh, S.I., Park, Y.M., Oh, S., Shin, J.G., Yao, S., Chen, L. & Choi, I.H. *Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression and IFN-gamma-induced upregulation of B7-H1 (CD274)*. *FEBS Lett* 580, 755-762 (2006).
190. Hess, K., Ushmorov, A., Fiedler, J., Brenner, R.E. & Wirth, T. *TNFalpha promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by triggering the NF-kappaB signaling pathway*. *Bone* 45, 367-376 (2009).
191. Li, W., Yu, B., Li, M., Sun, D., Hu, Y., Zhao, M., Cui, C.B. & Hou, S. *NEMO-binding domain peptide promotes osteoblast differentiation impaired by tumor necrosis factor alpha*. *Biochem Biophys Res Commun* 391, 1228-1233 (2010).
192. Yao, S., Prpic, V., Pan, F. & Wise, G.E. *TNF-alpha upregulates expression of BMP-2 and BMP-3 genes in the rat dental follicle--implications for tooth eruption*. *Connect Tissue Res* 51, 59-66 (2010).
193. Groschel, S., Piggott, K.D., Vaglio, A., Ma-Krupa, W., Singh, K., Goronzy, J.J. & Weyand, C.M. *TLR-mediated induction of negative regulatory ligands on dendritic cells*. *J Mol Med (Berl)* 86, 443-455 (2008).

194. de la Pena, L.S., Billings, P.C., Fiori, J.L., Ahn, J., Kaplan, F.S. & Shore, E.M. *Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP), a disorder of ectopic osteogenesis, misregulates cell surface expression and trafficking of BMPRIA*. *J Bone Miner Res* 20, 1168-1176 (2005).
195. Paz Morante, M., Briones, J., Canto, E., Sabzevari, H., Martino, R., Sierra, J., Rodriguez-Sanchez, J.L. & Vidal, S. *Activation-associated phenotype of CD3 T cells in acute graft-versus-host disease*. *Clin Exp Immunol* 145, 36-43 (2006).
196. Tzachanis, D., Li, L., Lafuente, E.M., Berezovskaya, A., Freeman, G.J. & Boussiotis, V.A. *Twisted gastrulation (Tsg) is regulated by Tob and enhances TGF-beta signaling in activated T lymphocytes*. *Blood* 109, 2944-2952 (2007).
197. Robson, N.C., Phillips, D.J., McAlpine, T., Shin, A., Svobodova, S., Toy, T., Pillay, V., Kirkpatrick, N., Zanker, D., Wilson, K., Helling, I., Wei, H., Chen, W., Cebon, J. & Maraskovsky, E. *Activin-A: a novel dendritic cell-derived cytokine that potently attenuates CD40 ligand-specific cytokine and chemokine production*. *Blood* 111, 2733-2743 (2008).
198. Izumi, M., Fujio, Y., Kunisada, K., Negoro, S., Tone, E., Funamoto, M., Osugi, T., Oshima, Y., Nakaoka, Y., Kishimoto, T., Yamauchi-Takahara, K. & Hirota, H. *Bone morphogenetic protein-2 inhibits serum deprivation-induced apoptosis of neonatal cardiac myocytes through activation of the Smad1 pathway*. *J Biol Chem* 276, 31133-31141 (2001).
199. Noth, U., Tuli, R., Seghatoleslami, R., Howard, M., Shah, A., Hall, D.J., Hickok, N.J. & Tuan, R.S. *Activation of p38 and Smads mediates BMP-2 effects on human trabecular bone-derived osteoblasts*. *Exp Cell Res* 291, 201-211 (2003).
200. Nickel, J., Sebald, W., Groppe, J.C. & Mueller, T.D. *Intricacies of BMP receptor assembly*. *Cytokine Growth Factor Rev* 20, 367-377 (2009).
201. Guzman, A., Zelman-Femiak, M., Boergermann, J.H., Paschkowsky, S., Kreuzaler, P.A., Fratzl, P., Harms, G.S. & Knaus, P. *SMAD versus non-SMAD signaling is determined by lateral mobility of bone morphogenetic protein (BMP) receptors*. *J Biol Chem* 287, 39492-39504 (2012).
202. Marom, B., Heining, E., Knaus, P. & Henis, Y.I. *Formation of stable homomeric and transient heteromeric bone morphogenetic protein (BMP) receptor complexes regulates Smad protein signaling*. *J Biol Chem* 286, 19287-19296 (2011).
203. Nohe, A., Keating, E., Underhill, T.M., Knaus, P. & Petersen, N.O. *Effect of the distribution and clustering of the type I A BMP receptor (ALK3) with the type II BMP receptor on the activation of signalling pathways*. *J Cell Sci* 116, 3277-3284 (2003).
204. Ehrlich, M., Horbelt, D., Marom, B., Knaus, P. & Henis, Y.I. *Homomeric and heteromeric complexes among TGF-beta and BMP receptors and their roles in signaling*. *Cell Signal* 23, 1424-1432 (2011).
205. Billings, P.C., Fiori, J.L., Bentwood, J.L., O'Connell, M.P., Jiao, X., Nussbaum, B., Caron, R.J., Shore, E.M. & Kaplan, F.S. *Dysregulated BMP signaling and enhanced osteogenic differentiation of connective tissue progenitor cells from patients with fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP)*. *J Bone Miner Res* 23, 305-313 (2008).
206. Chen, J., Sun, W., Zheng, Y., Xiong, H. & Cai, Y. *Bone morphogenetic protein 4, inhibitor of differentiation 1, and epidermal growth factor receptor regulate the survival of cochlear sensory epithelial cells*. *J Neurosci Res* 91, 515-526 (2013).
207. Kamiura, N., Hirahashi, J., Matsuzaki, Y., Idei, M., Takase, O., Fujita, T., Takato, T. & Hishikawa, K. *Basic helix-loop-helix transcriptional factor MyoR regulates BMP-7 in acute kidney injury*. *Am J Physiol Renal Physiol* 304, F1159-1166 (2013).
208. Langenfeld, E., Hong, C.C., Lanke, G. & Langenfeld, J. *Bone morphogenetic protein type I receptor antagonists decrease growth and induce cell death of lung cancer cell lines*. *PLoS One* 8, e61256 (2013).
209. Ten Dijke, P., Goumans, M.J., Itoh, F. & Itoh, S. *Regulation of cell proliferation by Smad proteins*. *J Cell Physiol* 191, 1-16 (2002).
210. Ying, Q.L., Nichols, J., Chambers, I. & Smith, A. *BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3*. *Cell* 115, 281-292 (2003).
211. Liu, J., Wilson, S. & Reh, T. *BMP receptor 1b is required for axon guidance and cell survival in the developing retina*. *Dev Biol* 256, 34-48 (2003).
212. Vicente Lopez, M.A., Vazquez Garcia, M.N., Entrena, A., Olmedillas Lopez, S., Garcia-Arranz, M., Garcia-Olmo, D. & Zapata, A. *Low doses of bone morphogenetic protein 4 increase the survival of human adipose-derived stem cells maintaining their stemness and multipotency*. *Stem Cells Dev* 20, 1011-1019 (2011).

213. Barneda-Zahonero, B., Minano-Molina, A., Badiola, N., Fado, R., Xifro, X., Saura, C.A. & Rodriguez-Alvarez, J. *Bone morphogenetic protein-6 promotes cerebellar granule neurons survival by activation of the MEK/ERK/CREB pathway*. *Mol Biol Cell* 20, 5051-5063 (2009).
214. Gautier, E.L., Huby, T., Saint-Charles, F., Ouzilleau, B., Chapman, M.J. & Lesnik, P. *Enhanced dendritic cell survival attenuates lipopolysaccharide-induced immunosuppression and increases resistance to lethal endotoxic shock*. *J Immunol* 180, 6941-6946 (2008).
215. Steinman, R.M. & Hemmi, H. *Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity*. *Curr Top Microbiol Immunol* 311, 17-58 (2006).
216. Fassbender, M., Herter, S., Holtappels, R. & Schild, H. *Correlation of dendritic cell maturation and the formation of aggregates of poly-ubiquitinated proteins in the cytosol*. *Med Microbiol Immunol* 197, 185-189 (2008).
217. Garrett, W.S., Chen, L.M., Kroschewski, R., Ebersold, M., Turley, S., Trombetta, S., Galan, J.E. & Mellman, I. *Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42*. *Cell* 102, 325-334 (2000).
218. Huang, Y., Biswas, C., Klos Dehring, D.A., Sriram, U., Williamson, E.K., Li, S., Clarke, F., Gallucci, S., Argon, Y. & Burkhardt, J.K. *The actin regulatory protein HSL is required for antigen uptake and presentation by dendritic cells*. *J Immunol* 187, 5952-5963 (2011).
219. Sarkar, K., Kruhlak, M.J., Erlandsen, S.L. & Shaw, S. *Selective inhibition by rottlerin of macropinocytosis in monocyte-derived dendritic cells*. *Immunology* 116, 513-524 (2005).
220. Drutman, S.B. & Trombetta, E.S. *Dendritic cells continue to capture and present antigens after maturation in vivo*. *J Immunol* 185, 2140-2146 (2010).
221. Platt, C.D., Ma, J.K., Chalouni, C., Ebersold, M., Bou-Reslan, H., Carano, R.A., Mellman, I. & Delamarre, L. *Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 4287-4292 (2010).
222. Cohen, M.M., Jr. *Perspectives on RUNX genes: an update*. *Am J Med Genet A* 149A, 2629-2646 (2009).
223. Pimanda, J.E., Donaldson, I.J., de Bruijn, M.F., Kinston, S., Knezevic, K., Huckle, L., Piltz, S., Landry, J.R., Green, A.R., Tannahill, D. & Gottgens, B. *The SCL transcriptional network and BMP signaling pathway interact to regulate RUNX1 activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 840-845 (2007).
224. Omar, O.M., Graneli, C., Ekstrom, K., Karlsson, C., Johansson, A., Lausmaa, J., Wexell, C.L. & Thomsen, P. *The stimulation of an osteogenic response by classical monocyte activation*. *Biomaterials* 32, 8190-8204 (2011).
225. Pirraco, R.P., Reis, R.L. & Marques, A.P. *Effect of monocytes/macrophages on the early osteogenic differentiation of hBMSCs*. *J Tissue Eng Regen Med* 7, 392-400 (2013).
226. Jonuleit, H., Kuhn, U., Muller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J. & Enk, A.H. *Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions*. *Eur J Immunol* 27, 3135-3142 (1997).
227. Hagen, M., Fagan, K., Steudel, W., Carr, M., Lane, K., Rodman, D.M. & West, J. *Interaction of interleukin-6 and the BMP pathway in pulmonary smooth muscle*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292, L1473-1479 (2007).
228. Nakashima, K. & Taga, T. *Mechanisms underlying cytokine-mediated cell-fate regulation in the nervous system*. *Mol Neurobiol* 25, 233-244 (2002).
229. Ratanavaraporn, J., Furuya, H. & Tabata, Y. *Local suppression of pro-inflammatory cytokines and the effects in BMP-2-induced bone regeneration*. *Biomaterials* 33, 304-316 (2012).
230. Walia, D.S., Sharma, M., Raveendran, V.V., Zhou, J., Sharma, R., Stechschulte, D.J. & Dileepan, K.N. *Human mast cells (HMC-1 5C6) enhance interleukin-6 production by quiescent and lipopolysaccharide-stimulated human coronary artery endothelial cells*. *Mediators Inflamm* 2012, 274347 (2012).
231. Aigner, T., Soeder, S. & Haag, J. *IL-1beta and BMPs--interactive players of cartilage matrix degradation and regeneration*. *Eur Cell Mater* 12, 49-56; discussion 56 (2006).
232. Ikeda, K., Souma, Y., Akakabe, Y., Kitamura, Y., Matsuo, K., Shimoda, Y., Ueyama, T., Matoba, S., Yamada, H., Okigaki, M. & Matsubara, H. *Macrophages play a unique role in the plaque calcification by enhancing the osteogenic signals exerted by vascular smooth muscle cells*. *Biochem Biophys Res Commun* 425, 39-44 (2012).
233. Merrihew, C., Soeder, S., Rueger, D.C., Kuettner, K.E. & Chubinskaya, S. *Modulation of endogenous osteogenic protein-1 (OP-1) by interleukin-1 in adult human articular cartilage*. *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 3, 67-74 (2003).

234. Mumme, M., Scotti, C., Papadimitropoulos, A., Todorov, A., Hoffmann, W., Bocelli-Tyndall, C., Jakob, M., Wendt, D., Martin, I. & Barbero, A. *Interleukin-1beta modulates endochondral ossification by human adult bone marrow stromal cells*. *Eur Cell Mater* 24, 224-236 (2012).
235. Blackwell, K.A., Hortschansky, P., Sanovic, S., Choudhary, S., Raisz, L.G. & Pilbeam, C.C. *Bone morphogenetic protein 2 enhances PGE(2)-stimulated osteoclast formation in murine bone marrow cultures*. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 90, 76-80 (2009).
236. Rego, E.B., Inubushi, T., Kawazoe, A., Miyauchi, M., Tanaka, E., Takata, T. & Tanne, K. *Effect of PGE(2) induced by compressive and tensile stresses on cementoblast differentiation in vitro*. *Arch Oral Biol* 56, 1238-1246 (2011).
237. Zhang, J. & Wang, J.H. *BMP-2 mediates PGE(2) -induced reduction of proliferation and osteogenic differentiation of human tendon stem cells*. *J Orthop Res* 30, 47-52 (2012).
238. Zhang, X., Schwarz, E.M., Young, D.A., Puzas, J.E., Rosier, R.N. & O'Keefe, R.J. *Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair*. *J Clin Invest* 109, 1405-1415 (2002).
239. Al-Aly, Z. *Arterial calcification: a tumor necrosis factor-alpha mediated vascular Wnt-opathy*. *Transl Res* 151, 233-239 (2008).
240. Csiszar, A., Ahmad, M., Smith, K.E., Labinskyy, N., Gao, Q., Kaley, G., Edwards, J.G., Wolin, M.S. & Ungvari, Z. *Bone morphogenetic protein-2 induces proinflammatory endothelial phenotype*. *Am J Pathol* 168, 629-638 (2006).
241. Lu, Z., Wang, G., Dunstan, C.R. & Zreiqat, H. *Short-term exposure to tumor necrosis factor-alpha enables human osteoblasts to direct adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into osteogenic differentiation*. *Stem Cells Dev* 21, 2420-2429 (2012).
242. Yu, Z., Seya, K., Daitoku, K., Motomura, S., Fukuda, I. & Furukawa, K. *Tumor necrosis factor-alpha accelerates the calcification of human aortic valve interstitial cells obtained from patients with calcific aortic valve stenosis via the BMP2-Dlx5 pathway*. *J Pharmacol Exp Ther* 337, 16-23 (2011).
243. Kawai, T. & Akira, S. *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. *Nat Immunol* 11, 373-384 (2010).
244. Goswami, M., Uzgare, A.R. & Sater, A.K. *Regulation of MAP kinase by the BMP-4/TAK1 pathway in Xenopus ectoderm*. *Dev Biol* 236, 259-270 (2001).
245. Greenblatt, M.B., Shim, J.H. & Glimcher, L.H. *TAK1 mediates BMP signaling in cartilage*. *Ann NY Acad Sci* 1192, 385-390 (2010).
246. Liu, C., Goswami, M., Talley, J., Chesser-Martinez, P.L., Lou, C.H. & Sater, A.K. *TAK1 promotes BMP4/Smad1 signaling via inhibition of erk MAPK: a new link in the FGF/BMP regulatory network*. *Differentiation* 83, 210-219 (2012).
247. Miura, S. & Mishina, Y. *Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (Hgs) is involved in BMP signaling through phosphorylation of SMADS and TAK1 in early mouse embryo*. *Dev Dyn* 240, 2474-2481 (2011).
248. Pal, A., Huang, W., Li, X., Toy, K.A., Nikolovska-Coleska, Z. & Kleer, C.G. *CCN6 modulates BMP signaling via the Smad-independent TAK1/p38 pathway, acting to suppress metastasis of breast cancer*. *Cancer Res* 72, 4818-4828 (2012).
249. von Bubnoff, A. & Cho, K.W. *Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network?* *Dev Biol* 239, 1-14 (2001).
250. Kaiser, M., Haag, J., Soder, S., Bau, B. & Aigner, T. *Bone morphogenetic protein and transforming growth factor beta inhibitory Smads 6 and 7 are expressed in human adult normal and osteoarthritic cartilage in vivo and are differentially regulated in vitro by interleukin-1beta*. *Arthritis Rheum* 50, 3535-3540 (2004).
251. Arrighi, J.F., Rebsamen, M., Rousset, F., Kindler, V. & Hauser, C. *A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF-alpha, and contact sensitizers*. *J Immunol* 166, 3837-3845 (2001).
252. Sato, K., Nagayama, H., Tadokoro, K., Juji, T. & Takahashi, T.A. *Extracellular signal-regulated kinase, stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase, and p38mapk are involved in IL-10-mediated selective repression of TNF-alpha-induced activation and maturation of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells*. *J Immunol* 162, 3865-3872 (1999).
253. Nakahara, T., Moroi, Y., Uchi, H. & Furue, M. *Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement*. *J Dermatol Sci* 42, 1-11 (2006).
254. Pan, K., Wang, H., Liu, W.L., Zhang, H.K., Zhou, J., Li, J.J., Weng, D.S., Huang, W., Sun, J.C., Liang, X.T. & Xia, J.C. *The pivotal role of p38 and NF-kappaB signal pathways in the*

- maturation of human monocyte-derived dendritic cells stimulated by streptococcal agent OK-432. *Immunobiology* 214, 350-358 (2009).
255. Kuka, M., Baronio, R., Valentini, S., Monaci, E., Muzzi, A., Aprea, S., De Gregorio, E. & D'Oro, U. *Src kinases are required for a balanced production of IL-12/IL-23 in human dendritic cells activated by Toll-like receptor agonists. PLoS One* 5, e11491 (2010).
 256. Napolitani, G., Bortoletto, N., Racioppi, L., Lanzavecchia, A. & D'Oro, U. *Activation of src-family tyrosine kinases by LPS regulates cytokine production in dendritic cells by controlling AP-1 formation. Eur J Immunol* 33, 2832-2841 (2003).
 257. Fric, J., Zelante, T., Wong, A.Y., Mertes, A., Yu, H.B. & Ricciardi-Castagnoli, P. *NFAT control of innate immunity. Blood* 120, 1380-1389 (2012).
 258. Vukcevic, M., Zorzato, F., Spagnoli, G. & Treves, S. *Frequent calcium oscillations lead to NFAT activation in human immature dendritic cells. J Biol Chem* 285, 16003-16011 (2010).
 259. Herrmann, T.L., Agrawal, R.S., Connolly, S.F., McCaffrey, R.L., Schlomann, J. & Kusner, D.J. *MHC Class II levels and intracellular localization in human dendritic cells are regulated by calmodulin kinase II. J Leukoc Biol* 82, 686-699 (2007).
 260. Herrmann, T.L., Morita, C.T., Lee, K. & Kusner, D.J. *Calmodulin kinase II regulates the maturation and antigen presentation of human dendritic cells. J Leukoc Biol* 78, 1397-1407 (2005).
 261. Connolly, S.F. & Kusner, D.J. *The regulation of dendritic cell function by calcium-signaling and its inhibition by microbial pathogens. Immunol Res* 39, 115-127 (2007).
 262. Rifas, L. *T-cell cytokine induction of BMP-2 regulates human mesenchymal stromal cell differentiation and mineralization. J Cell Biochem* 98, 706-714 (2006).
 263. Suto, M., Nemoto, E., Kanaya, S., Suzuki, R., Tsuchiya, M. & Shimauchi, H. *Nanohydroxyapatite increases BMP-2 expression via a p38 MAP kinase dependent pathway in periodontal ligament cells. Arch Oral Biol* 58, 1021-1028 (2013).
 264. Min, D.S., Shin, E.Y. & Kim, E.G. *The p38 mitogen-activated protein kinase is involved in stress-induced phospholipase D activation in vascular smooth muscle cells. Exp Mol Med* 34, 38-46 (2002).
 265. Nakajima, K., Tohyama, Y., Kohsaka, S. & Kurihara, T. *Protein kinase C alpha requirement in the activation of p38 mitogen-activated protein kinase, which is linked to the induction of tumor necrosis factor alpha in lipopolysaccharide-stimulated microglia. Neurochem Int* 44, 205-214 (2004).
 266. Nguyen, A., Chen, P. & Cai, H. *Role of CaMKII in hydrogen peroxide activation of ERK1/2, p38 MAPK, HSP27 and actin reorganization in endothelial cells. FEBS Lett* 572, 307-313 (2004).
 267. Takeda, K., Matsuzawa, A., Nishitoh, H., Tobiume, K., Kishida, S., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K. & Ichijo, H. *Involvement of ASK1 in Ca2+-induced p38 MAP kinase activation. EMBO Rep* 5, 161-166 (2004).
 268. Baeza-Raja, B. & Munoz-Canoves, P. *p38 MAPK-induced nuclear factor-kappaB activity is required for skeletal muscle differentiation: role of interleukin-6. Mol Biol Cell* 15, 2013-2026 (2004).
 269. Olson, C.M., Hedrick, M.N., Izadi, H., Bates, T.C., Olivera, E.R. & Anguita, J. *p38 mitogen-activated protein kinase controls NF-kappaB transcriptional activation and tumor necrosis factor alpha production through RelA phosphorylation mediated by mitogen- and stress-activated protein kinase 1 in response to Borrelia burgdorferi antigens. Infect Immun* 75, 270-277 (2007).
 270. Vazquez de la Torre, A., Junyent, F., Folch, J., Pelegri, C., Vilaplana, J., Auladell, C., Beas-Zarate, C., Pallas, M., Verdager, E. & Camins, A. *PI3 k/akt inhibition induces apoptosis through p38 activation in neurons. Pharmacol Res* 70, 116-125 (2013).
 271. Petrovas, C., Casazza, J.P., Brenchley, J.M., Price, D.A., Gostick, E., Adams, W.C., Precopio, M.L., Schacker, T., Roederer, M., Douek, D.C. & Koup, R.A. *PD-1 is a regulator of virus-specific CD8+ T cell survival in HIV infection. J Exp Med* 203, 2281-2292 (2006).
 272. Hubo, M., Trinschek, B., Kryczanowsky, F., Tuettenberg, A., Steinbrink, K. & Jonuleit, H. *Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. Front Immunol* 4, 82 (2013).
 273. Dong, H., Zhu, G., Tamada, K. & Chen, L. *B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. Nat Med* 5, 1365-1369 (1999).
 274. Okazaki, T. & Honjo, T. *PD-1 and PD-1 ligands: from discovery to clinical application. Int Immunol* 19, 813-824 (2007).

275. Kuipers, H., Muskens, F., Willart, M., Hijdra, D., van Assema, F.B., Coyle, A.J., Hoogsteden, H.C. & Lambrecht, B.N. *Contribution of the PD-1 ligands/PD-1 signaling pathway to dendritic cell-mediated CD4⁺ T cell activation.* *Eur J Immunol* 36, 2472-2482 (2006).
276. Messal, N., Serriari, N.E., Pastor, S., Nunes, J.A. & Olive, D. *PD-L2 is expressed on activated human T cells and regulates their function.* *Mol Immunol* 48, 2214-2219 (2011).
277. Eppihimer, M.J., Gunn, J., Freeman, G.J., Greenfield, E.A., Chernova, T., Erickson, J. & Leonard, J.P. *Expression and regulation of the PD-L1 immunoinhibitory molecule on microvascular endothelial cells.* *Microcirculation* 9, 133-145 (2002).
278. Freeman, G.J., Long, A.J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L.J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M.C., Horton, H.F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M.R., Carreno, B.M., Collins, M., Wood, C.R. & Honjo, T. *Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation.* *J Exp Med* 192, 1027-1034 (2000).
279. Selenko-Gebauer, N., Majdic, O., Szekeres, A., Hofler, G., Guthann, E., Korthauer, U., Zlabinger, G., Steinberger, P., Pickl, W.F., Stockinger, H., Knapp, W. & Stockl, J. *B7-H1 (programmed death-1 ligand) on dendritic cells is involved in the induction and maintenance of T cell anergy.* *J Immunol* 170, 3637-3644 (2003).
280. Lee, J., Zhuang, Y., Wei, X., Shang, F., Wang, J., Zhang, Y., Liu, X., Yang, Y., Liu, L. & Zheng, Q. *Contributions of PD-1/PD-L1 pathway to interactions of myeloid DCs with T cells in atherosclerosis.* *J Mol Cell Cardiol* 46, 169-176 (2009).
281. Liang, S.C., Latchman, Y.E., Buhlmann, J.E., Tomczak, M.F., Horwitz, B.H., Freeman, G.J. & Sharpe, A.H. *Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses.* *Eur J Immunol* 33, 2706-2716 (2003).
282. Ito, T., Ueno, T., Clarkson, M.R., Yuan, X., Jurewicz, M.M., Yagita, H., Azuma, M., Sharpe, A.H., Auchincloss, H., Jr., Sayegh, M.H. & Najafian, N. *Analysis of the role of negative T cell costimulatory pathways in CD4 and CD8 T cell-mediated alloimmune responses in vivo.* *J Immunol* 174, 6648-6656 (2005).
283. Chen, L., Zhang, Z., Chen, W., Li, Y., Shi, M., Zhang, J., Wang, S. & Wang, F.S. *B7-H1 up-regulation on myeloid dendritic cells significantly suppresses T cell immune function in patients with chronic hepatitis B.* *J Immunol* 178, 6634-6641 (2007).
284. Iwai, Y., Ishida, M., Tanaka, Y., Okazaki, T., Honjo, T. & Minato, N. *Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 12293-12297 (2002).
285. Lukens, J.R., Cruise, M.W., Lassen, M.G. & Hahn, Y.S. *Blockade of PD-1/B7-H1 interaction restores effector CD8⁺ T cell responses in a hepatitis C virus core murine model.* *J Immunol* 180, 4875-4884 (2008).
286. Loke, P. & Allison, J.P. *PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5336-5341 (2003).
287. Zhong, X., Tumang, J.R., Gao, W., Bai, C. & Rothstein, T.L. *PD-L2 expression extends beyond dendritic cells/macrophages to B1 cells enriched for V(H)11/V(H)12 and phosphatidylcholine binding.* *Eur J Immunol* 37, 2405-2410 (2007).
288. Breton, G., Yassine-Diab, B., Cohn, L., Boulassel, M.R., Routy, J.P., Sekaly, R.P. & Steinman, R.M. *siRNA knockdown of PD-L1 and PD-L2 in monocyte-derived dendritic cells only modestly improves proliferative responses to Gag by CD8(+) T cells from HIV-1-infected individuals.* *J Clin Immunol* 29, 637-645 (2009).
289. Shen, T., Chen, X., Chen, Y., Xu, Q., Lu, F. & Liu, S. *Increased PD-L1 expression and PD-L1/CD86 ratio on dendritic cells were associated with impaired dendritic cells function in HCV infection.* *J Med Virol* 82, 1152-1159 (2010).
290. Tokita, D., Mazariegos, G.V., Zahorchak, A.F., Chien, N., Abe, M., Raimondi, G. & Thomson, A.W. *High PD-L1/CD86 ratio on plasmacytoid dendritic cells correlates with elevated T-regulatory cells in liver transplant tolerance.* *Transplantation* 85, 369-377 (2008).
291. Trabattoni, D., Saresella, M., Biasin, M., Boasso, A., Piacentini, L., Ferrante, P., Dong, H., Maserati, R., Shearer, G.M., Chen, L. & Clerici, M. *B7-H1 is up-regulated in HIV infection and is a novel surrogate marker of disease progression.* *Blood* 101, 2514-2520 (2003).
292. Brown, J.A., Dorfman, D.M., Ma, F.R., Sullivan, E.L., Munoz, O., Wood, C.R., Greenfield, E.A. & Freeman, G.J. *Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production.* *J Immunol* 170, 1257-1266 (2003).
293. Palmer, B.E., Neff, C.P., Lecureux, J., Ehler, A., Dsouza, M., Remling-Mulder, L., Korman, A.J., Fontenot, A.P. & Akkina, R. *In vivo blockade of the PD-1 receptor suppresses HIV-1 viral loads and improves CD4⁺ T cell levels in humanized mice.* *J Immunol* 190, 211-219 (2013).

294. Peng, W., Ran, B., Ma, Y., Huang, X., Chang, Q. & Wang, X. *Dendritic cells transfected with PD-L1 recombinant adenovirus induces T cell suppression and long-term acceptance of allograft transplantation. Cell Immunol* 271, 73-77 (2011).
295. Wei, F., Zhong, S., Ma, Z., Kong, H., Medvec, A., Ahmed, R., Freeman, G.J., Krogsgaard, M. & Riley, J.L. *Strength of PD-1 signaling differentially affects T-cell effector functions. Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E2480-2489 (2013).
296. Fernandez, N.C., Lozier, A., Flament, C., Ricciardi-Castagnoli, P., Bellet, D., Suter, M., Perricaudet, M., Tursz, T., Maraskovsky, E. & Zitvogel, L. *Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. Nat Med* 5, 405-411 (1999).
297. Gustafsson, K., Ingelsten, M., Bergqvist, L., Nystrom, J., Andersson, B. & Karlsson-Parra, A. *Recruitment and activation of natural killer cells in vitro by a human dendritic cell vaccine. Cancer Res* 68, 5965-5971 (2008).
298. Walzer, T., Dalod, M., Vivier, E. & Zitvogel, L. *Natural killer cell-dendritic cell crosstalk in the initiation of immune responses. Expert Opin Biol Ther* 5 Suppl 1, S49-59 (2005).
299. Barreira da Silva, R. & Munz, C. *Natural killer cell activation by dendritic cells: balancing inhibitory and activating signals. Cell Mol Life Sci* 68, 3505-3518 (2011).
300. Benson, D.M., Jr., Bakan, C.E., Mishra, A., Hofmeister, C.C., Efebera, Y., Becknell, B., Baiocchi, R.A., Zhang, J., Yu, J., Smith, M.K., Greenfield, C.N., Porcu, P., Devine, S.M., Rotem-Yehudar, R., Lozanski, G., Byrd, J.C. & Caligiuri, M.A. *The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. Blood* 116, 2286-2294 (2010).
301. Dolina, J.S., Sung, S.S., Novobrantseva, T.I., Nguyen, T.M. & Hahn, Y.S. *Lipidoid Nanoparticles Containing PD-L1 siRNA Delivered In Vivo Enter Kupffer Cells and Enhance NK and CD8(+) T Cell-mediated Hepatic Antiviral Immunity. Mol Ther Nucleic Acids* 2, e72 (2013).
302. Durand-Panteix, S., Farhat, M., Youlyouz-Marfak, I., Rouaud, P., Ouk-Martin, C., David, A., Faumont, N., Feuillard, J. & Jayat-Vignoles, C. *B7-H1, which represses EBV-immortalized B cell killing by autologous T and NK cells, is oppositely regulated by c-Myc and EBV latency III program at both mRNA and secretory lysosome levels. J Immunol* 189, 181-190 (2012).
303. Pan, X.C., Li, L., Mao, J.J., Yao, W., Zheng, J.N., Liu, M. & Fu, J.J. *Synergistic effects of soluble PD-1 and IL-21 on antitumor immunity against H22 murine hepatocellular carcinoma. Oncol Lett* 5, 90-96 (2013).
304. Norris, S., Coleman, A., Kuri-Cervantes, L., Bower, M., Nelson, M. & Goodier, M.R. *PD-1 expression on natural killer cells and CD8(+) T cells during chronic HIV-1 infection. Viral Immunol* 25, 329-332 (2012).
305. Wiesmayr, S., Webber, S.A., Macedo, C., Popescu, I., Smith, L., Luce, J. & Metes, D. *Decreased Nkp46 and NKG2D and elevated PD-1 are associated with altered NK-cell function in pediatric transplant patients with PTLT. Eur J Immunol* 42, 541-550 (2012).
306. Antonios, D., Rousseau, P., Larange, A., Kerdine-Romer, S. & Pallardy, M. *Mechanisms of IL-12 synthesis by human dendritic cells treated with the chemical sensitizer NiSO4. J Immunol* 185, 89-98 (2010).
307. Metenou, S., Kovacs, M., Dembele, B., Coulibaly, Y.I., Klion, A.D. & Nutman, T.B. *Interferon regulatory factor modulation underlies the bystander suppression of malaria antigen-driven IL-12 and IFN-gamma in filaria-malaria co-infection. Eur J Immunol* 42, 641-650 (2012).
308. Owens, B.M., Moore, J.W. & Kaye, P.M. *IRF7 regulates TLR2-mediated activation of splenic CD11c(hi) dendritic cells. PLoS One* 7, e41050 (2012).
309. Stein, M.F., Lang, S., Winkler, T.H., Deinzer, A., Erber, S., Nettelbeck, D.M., Naschberger, E., Jochmann, R., Sturzl, M., Slany, R.K., Werner, T., Steinkasserer, A. & Knippertz, I. *Multiple interferon regulatory factor and NF-kappaB sites cooperate in mediating cell-type- and maturation-specific activation of the human CD83 promoter in dendritic cells. Mol Cell Biol* 33, 1331-1344 (2013).
310. la Sala, A., He, J., Laricchia-Robbio, L., Gorini, S., Iwasaki, A., Braun, M., Yap, G.S., Sher, A., Ozato, K. & Kelsall, B. *Cholera toxin inhibits IL-12 production and CD8alpha+ dendritic cell differentiation by cAMP-mediated inhibition of IRF8 function. J Exp Med* 206, 1227-1235 (2009).
311. Tamura, T., Tailor, P., Yamaoka, K., Kong, H.J., Tsujimura, H., O'Shea, J.J., Singh, H. & Ozato, K. *IFN regulatory factor-4 and -8 govern dendritic cell subset development and their functional diversity. J Immunol* 174, 2573-2581 (2005).

312. Nakashima, K., Yanagisawa, M., Arakawa, H., Kimura, N., Hisatsune, T., Kawabata, M., Miyazono, K. & Taga, T. *Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300*. *Science* 284, 479-482 (1999).
313. Yarilina, A., Park-Min, K.H., Antoniv, T., Hu, X. & Ivashkiv, L.B. *TNF activates an IRF1-dependent autocrine loop leading to sustained expression of chemokines and STAT1-dependent type I interferon-response genes*. *Nat Immunol* 9, 378-387 (2008).
314. Dhar, D., Roy, S. & Das, S. *Translational control of the interferon regulatory factor 2 mRNA by IRES element*. *Nucleic Acids Res* 35, 5409-5421 (2007).
315. Gira, A.K., Casper, K.A., Otto, K.B., Naik, S.M., Caughman, S.W. & Swerlick, R.A. *Induction of interferon regulatory factor 1 expression in human dermal endothelial cells by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha is transcriptionally regulated and requires iron*. *J Invest Dermatol* 121, 1191-1196 (2003).
316. Pamment, J., Ramsay, E., Kelleher, M., Dornan, D. & Ball, K.L. *Regulation of the IRF-1 tumour modifier during the response to genotoxic stress involves an ATM-dependent signalling pathway*. *Oncogene* 21, 7776-7785 (2002).
317. Barach, Y.S., Lee, J.S. & Zang, X. *T cell coinhibition in prostate cancer: new immune evasion pathways and emerging therapeutics*. *Trends Mol Med* (2010).
318. Marzec, M., Zhang, Q., Goradia, A., Raghunath, P.N., Liu, X., Paessler, M., Wang, H.Y., Wysocka, M., Cheng, M., Ruggeri, B.A. & Wasik, M.A. *Oncogenic kinase NPM/ALK induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1)*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20852-20857 (2008).
319. Ara, J., See, J., Mamontov, P., Hahn, A., Bannerman, P., Pleasure, D. & Grinspan, J.B. *Bone morphogenetic proteins 4, 6, and 7 are up-regulated in mouse spinal cord during experimental autoimmune encephalomyelitis*. *J Neurosci Res* 86, 125-135 (2008).
320. Helbing, T., Herold, E.M., Hornstein, A., Wintrich, S., Heinke, J., Grundmann, S., Patterson, C., Bode, C. & Moser, M. *Inhibition of BMP activity protects epithelial barrier function in lung injury*. *J Pathol* 231, 105-116 (2013).
321. Kallioniemi, A. *Bone morphogenetic protein 4-a fascinating regulator of cancer cell behavior*. *Cancer Genet* 205, 267-277 (2012).
322. Liu, J., Ma, K.L., Gao, M., Wang, C.X., Ni, J., Zhang, Y., Zhang, X.L., Liu, H., Wang, Y.L. & Liu, B.C. *Inflammation disrupts the LDL receptor pathway and accelerates the progression of vascular calcification in ESRD patients*. *PLoS One* 7, e47217 (2012).
323. Lories, R.J., Derese, I., Ceuppens, J.L. & Luyten, F.P. *Bone morphogenetic proteins 2 and 6, expressed in arthritic synovium, are regulated by proinflammatory cytokines and differentially modulate fibroblast-like synoviocyte apoptosis*. *Arthritis Rheum* 48, 2807-2818 (2003).
324. Miriyala, S., Gongora Nieto, M.C., Mingone, C., Smith, D., Dikalov, S., Harrison, D.G. & Jo, H. *Bone morphogenetic protein-4 induces hypertension in mice: role of noggin, vascular NADPH oxidases, and impaired vasorelaxation*. *Circulation* 113, 2818-2825 (2006).
325. Torabi-Rahvar, M., Bozorgmehr, M., Jeddi-Tehrani, M. & Zarnani, A.H. *Potential strategies of dendritic cell-based antitumor vaccines: combinational therapy takes the front seat*. *Drug Discov Today* 16, 733-740 (2011).
326. Shurin, M.R., Gregory, M., Morris, J.C. & Malyguine, A.M. *Genetically modified dendritic cells in cancer immunotherapy: a better tomorrow?* *Expert Opin Biol Ther* 10, 1539-1553 (2010).
327. Granucci, F., Lutz, M.B. & Zanoni, I. *The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal 2*. *Front Immunol* 4, 198 (2013).
328. Kalinski, P., Hilken, C.M., Wierenga, E.A. & Kapsenberg, M.L. *T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal*. *Immunol Today* 20, 561-567 (1999).
329. Thomas, R. *Signal 3 and its role in autoimmunity*. *Arthritis Res Ther* 6, 26-27 (2004).
330. Blazar, B.R., Murphy, W.J. & Abedi, M. *Advances in graft-versus-host disease biology and therapy*. *Nat Rev Immunol* 12, 443-458 (2012).
331. Qureshi, O.S., Kaur, S., Hou, T.Z., Jeffery, L.E., Poulter, N.S., Briggs, Z., Kenefick, R., Willox, A.K., Royle, S.J., Rappoport, J.Z. & Sansom, D.M. *Constitutive clathrin-mediated endocytosis of CTLA-4 persists during T cell activation*. *J Biol Chem* 287, 9429-9440 (2012).
332. Bhatia, M., Bonnet, D., Wu, D., Murdoch, B., Wrana, J., Gallacher, L. & Dick, J.E. *Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells*. *J Exp Med* 189, 1139-1148 (1999).
333. Detmer, K. & Walker, A.N. *Bone morphogenetic proteins act synergistically with haematopoietic cytokines in the differentiation of haematopoietic progenitors*. *Cytokine* 17, 36-42 (2002).

334. Grassinger, J., Simon, M., Mueller, G., Drewel, D., Andreessen, R. & Hennemann, B. *Bone morphogenetic protein (BMP)-7 but not BMP-2 and BMP-4 improves maintenance of primitive peripheral blood-derived hematopoietic progenitor cells (HPC) cultured in serum-free medium supplemented with early acting cytokines.* *Cytokine* 40, 165-171 (2007).
335. Kamalian, L., Forootan, S.S., Bao, Z.Z., Zhang, Y., Gosney, J.R., Foster, C.S. & Ke, Y. *Inhibition of tumourigenicity of small cell lung cancer cells by suppressing Id3 expression.* *Int J Oncol* 37, 595-603 (2010).
336. Chen, Y.H., Wu, Z.Q., Zhao, Y.L., Si, Y.L., Guo, M.Z. & Han, W.D. *FHL2 inhibits the Id3-promoted proliferation and invasive growth of human MCF-7 breast cancer cells.* *Chin Med J (Engl)* 125, 2329-2333 (2012).
337. Tsai, C.L., Tsai, C.N., Lin, C.Y., Chen, H.W., Lee, Y.S., Chao, A., Wang, T.H., Wang, H.S. & Lai, C.H. *Secreted stress-induced phosphoprotein 1 activates the ALK2-SMAD signaling pathways and promotes cell proliferation of ovarian cancer cells.* *Cell Rep* 2, 283-293 (2012).
338. Chassot, A.A., Turchi, L., Virolle, T., Fitsialos, G., Batoz, M., Deckert, M., Dulic, V., Meneguzzi, G., Busca, R. & Ponzio, G. *Id3 is a novel regulator of p27kip1 mRNA in early G1 phase and is required for cell-cycle progression.* *Oncogene* 26, 5772-5783 (2007).
339. O'Brien, C.A., Kreso, A., Ryan, P., Hermans, K.G., Gibson, L., Wang, Y., Tsatsanis, A., Gallinger, S. & Dick, J.E. *ID1 and ID3 regulate the self-renewal capacity of human colon cancer-initiating cells through p21.* *Cancer Cell* 21, 777-792 (2012).
340. Sharma, P., Patel, D. & Chaudhary, J. *Id1 and Id3 expression is associated with increasing grade of prostate cancer: Id3 preferentially regulates CDKN1B.* *Cancer Med* 1, 187-197 (2012).
341. Sumida, T., Murase, R., Onishi-Ishikawa, A., McAllister, S.D., Hamakawa, H. & Desprez, P.Y. *Targeting Id1 reduces proliferation and invasion in aggressive human salivary gland cancer cells.* *BMC Cancer* 13, 141 (2013).
342. Engel, I. & Murre, C. *The function of E- and Id proteins in lymphocyte development.* *Nat Rev Immunol* 1, 193-199 (2001).
343. Liu, C., Jin, R., Wang, H.C., Tang, H., Liu, Y.F., Qian, X.P., Sun, X.Y., Ge, Q., Sun, X.H. & Zhang, Y. *Id1 expression promotes peripheral CD4+ T cell proliferation and survival upon TCR activation without co-stimulation.* *Biochem Biophys Res Commun* 436, 47-52 (2013).
344. Malek, T.R. *The biology of interleukin-2.* *Annu Rev Immunol* 26, 453-479 (2008).
345. Jain, J., Loh, C. & Rao, A. *Transcriptional regulation of the IL-2 gene.* *Curr Opin Immunol* 7, 333-342 (1995).
346. Lin, J.X. & Leonard, W.J. *Signaling from the IL-2 receptor to the nucleus.* *Cytokine Growth Factor Rev* 8, 313-332 (1997).

SUMMARY

INTRODUCTION

Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) are conserved, secreted growth factors belonging to the Transforming Growth Factor beta (TGF- β) superfamily¹. First discovered by their potential to induce ectopic bone and cartilage formation², BMPs play an essential role orchestrating the embryogenic development. Further works have established this subfamily of proteins as multifunctional factors deeply involved in the homeostasis of a wide array of organs in the adult state, including the hematopoietic and immune system³.

Initially expressed as large precursor proteins, the active form of BMPs are formed by dimeric complexes capable of binding to their cognate receptors with different affinities⁴ which in part can condition their biological activities⁵. BMP ligands signal through tetrameric complex receptors composed by two type I (ActRIA/ALK-2, BMPRIA/ALK-3 and BMPRII/ALK-6) and two type II (BMPRII, ActRIIA and ActRIIB) receptors. Type II receptors have a constitutive kinase activity that once the BMP ligand binds to the receptor complex, transphosphorylates the type I receptors. Canonical BMP signaling is initiated when BMP receptor-regulated Smad proteins (BR-Smad or Smad-1, -5 and -8) are activated by type I receptors and form complexes with the common Smad (Co-Smad or Smad-4) that are translocated to the nucleus where they, together with different transcriptional co-activators and co-repressors, modulate the expression of several genes^{6,7}. Among BMP target genes, ID proteins (Inhibition of differentiation, ID1-4) are probably the most characterized mediators of many of the biological responses induced by BMPs^{8,9}. Besides ID proteins, the transcription factors RUNX (Runt-related proteins 1-3), have been as well extensively studied as BMP target genes¹⁰. Moreover, RUNX and Smad proteins can physically interact cooperating in the modulation of the transcription of different target genes induced by BMPs¹¹.

Apart from the canonical BMP signaling pathway, several works have pointed out the existence of non canonical pathways mediating BMP activities. The main alternative pathways are governed by the three MAPKs p38, MEK/Erk and JNK which can be activated by TAK1 in response to BMP, but there are solid evidences that BMP signals can be equally transduced through the proteins PI3K/Akt, PKA and PKD¹²⁻¹⁴. To make things more complicated, TAK1 has been demonstrated to activate BR-Smads, showing thus how interconnected these pathways can be¹⁵.

Regarding BMP functions, this group of proteins actively participate in essential processes during embryogenesis so that defects in BMP signaling pathways affect

development of teeth, kidney, skin, hair, muscle, neural system and hematopoiesis¹⁶. Moreover, mice which do not express *Bmp-2* and/or *Bmp-4*, as well as *Bmpr1a* and *BmprII*, die between day 6.5 and 9.5 *postcoitum* as a result of defects in gastrulation and mesoderm formation¹⁷⁻¹⁹. Therefore, it is not surprising that a large number of disorders have been associated to alterations of different nature in this pathway. These pathologies include fibrodysplasia ossificans progressiva²⁰, rheumatoid arthritis²¹, multiple sclerosis²², airway inflammation²³ and vascular diseases²⁴, among others. In addition, aberrant expression of BMP ligands has been found in several types of cancer such as melanoma, gastric, basal and renal cancer and carcinomas including squamous cells from head and neck²⁵.

In relation to the immune system, it is well documented that BMPs participate in modulating hematopoietic stem cell differentiation and homeostasis²⁶, but also in regulating different aspects of more defined immune cell lineages. More specifically, BMP signaling plays a pivotal role during T cell development within the thymus^{27,28}, and moreover, the activation of this pathway promotes the acquisition of effector functions in mature T cells²⁹⁻³¹. Concerning B cells, BMPs are able to both promote and inhibit B lymphocyte differentiation^{32,33} and this dual role of BMP ligands has also been described in the activation of B cells triggered by different stimulus³⁴⁻³⁶. The relation between NK cells and BMPs had not been studied until the publication by our group of a work showing that expression of BMPRIA on CD34⁺ intrathymic precursor cells is a marker for NK cell lineage commitment and that autocrine/paracrine BMP signaling is necessary in these cells for their differentiation towards NK cells³⁷.

As regards to phagocytic cells, monocytes have been shown to express several components of the BMP signaling pathway³⁸ and the spectrum of activities of BMPs on these cells goes from osteoclast differentiation to chemotaxis and cytokine production (³⁹⁻⁴¹; and data not shown). Macrophages are able to produce BMP ligands under certain circumstances^{42,43} and also BMP stimulation induces on macrophages the production of a number of proinflammatory cytokines⁴⁴⁻⁴⁷.

Since their discovery approximately forty years ago^{48,49}, the unarguable function of dendritic cells (DCs) in the adaptive response to foreign antigens and in the induction of tolerance to self antigens has led to the extensive study of these cells with clinical purposes. From the time of the appearance of the monocyte-derived dendritic cells system, this model has proven to be not only a reliable platform to increase our knowledge about the biology of DCs, but also to be a breakthrough in the immune

therapies' history. In contrast to other immune cells types, very little is known about the possible role that BMPs could play in DCs, apart from two works reporting some opposite effects^{50,51}.

OBJECTIVE

The objective of the present work will be to analyze:

1. The expression of the complete and functional machinery for BMP signaling on immature (iDCs) and mature DCs (mDCs).
2. The effect of BMP stimulation on the survival, phenotype and functionality of iDCs.
3. The production of BMP ligands by DCs under different conditions.
4. The activation of BMP signaling over DC maturation and the effect of blocking this pathway on mDCs features.
5. The ability of CD4⁺ T cells to respond to BMPs and the role of BMP signaling during DC-T cell interaction.

METHODS

DCs were generated from peripheral blood monocytes by culturing in AIM-V media supplemented with 20 ng/ml IL-4 and 20 ng/ml GM-CSF, alone or in the presence of BMP-4 (1, 10 or 100 ng/ml), and matured with a cytokine cocktail including 10 ng/ml IL-1 β , 15 ng/ml IL-6, 10 ng/ml TNF α and 1 mg/ml PGE2. The expression of several BMP signaling components and the BMP-4-induced BR-Smads phosphorylation and IDs mRNA modulation were analyzed on iDCs and mDCs by flow cytometry and quantitative real time PCR.

Survival, phenotype, cytokine production and allostimulatory capacity of BMP-4-stimulated (50 ng/ml) iDCs were studied and the effect on mDCs features of BMP signaling blockade by treatment with dorsomorphin (DM) during maturation was evaluated. IRF1 silencing was carried out in iDCs by specific siRNAs before maturation with the cytokine cocktail and the resulting mDCs were analyzed by flow cytometry and quantitative real time PCR.

CD3/CD28 stimulation of naive CD4⁺ T lymphocytes and allogeneic T cells-mDCs co-cultures were performed under different conditions to study the role of BMP signaling on T cell activation.

RESULTS AND DISCUSSION

Our results show that iDCs and mDCs are able to both phosphorylate BR-Smads and increase the BMP target genes ID1-3⁹ mRNAs expression in response to BMP-4 stimulation. BMP-4-induced expression of IDs in iDCs and mDCs was mediated by the canonical BMP signaling pathway, with the exception of ID2 expression in mDCs which was blocked only by the p38 MAPK inhibitor. The change on the pathway used for BMP signaling between iDCs and mDCs could be explained by the different profile of receptors expressed in both states which has been demonstrated in different systems to condition the ligand affinity and signaling pathway activated³⁸.

Since iDCs can respond to BMPs, and once the stimulation of the BMP signaling pathway during DC differentiation was proven not to affect this process, we studied whether BMPs could modulate several functions of iDCs. The activation of the BMP pathway by BMP-4 addition to iDCs cultures increased their survival in the absence of growth factors and also the expression of a number of maturation markers. This treatment did not affect the endocytic capacity of this cells but enhanced the production of proinflammatory cytokines such as IL-8, IL-10, IL-6 and TNF α , but not IL-1 β . As a result, BMP-stimulated iDCs showed an augmented ability to induce allogeneic T cell proliferation and IFN γ secretion. This is in contrast with a work published by Pluchino et al⁵¹, showing that the addition of BMP-4 exerted a negative effect on LPS-induced maturation of bone marrow-derived DCs. The different origin of the DCs employed in this work and the fact that they did not detect BR-Smad phosphorylation could be the explanation for this controversy.

In relation with the molecular mechanisms mediating BMP-induced maturation of DCs, the fact that BMP-4 increases ID1-3 and Runx1-3 mRNA expression in iDCs could be associated with the observed maturation of these cells. Runx proteins have been described as BMP targets in many cell types¹⁰ and are also involved in DC maturation⁵²⁻⁵⁵. On the other hand, ID proteins have been comparatively involved in the differentiation of different DC subpopulations⁵⁶. Therefore, the maturation features induced on iDCs upon BMP signaling stimulation could be mediated at least in part by ID and Runx proteins.

With respect to the exogenous activation of the BMP signaling pathway during DC maturation, no effects were found when BMP-4 was added either together with the cytokine cocktail during DC maturation, or to mDCs cultures. These results prompted

us to study whether autocrine activation of BMP signaling could be masking a possible effect of BMP addition. The PCR and ELISA analysis showed that both iDCs and mDCs, but not monocytes, produced BMP ligands and that this expression was gradually augmented over the cytokine-induced DC maturation. Moreover, BR-Smads phosphorylation was also induced, indicating that BMP ligands act on DCs in an autocrine/paracrine manner. Similarly, BMP-4 secretion by DCs was also observed when different stimulus such as CD40-L and TLR agonists were assayed, suggesting that BMP ligand expression could be a common mechanism of DC maturation.

The blockade of canonical BMP signaling in the course of DC maturation by the addition of the inhibitory small molecule DM, that inhibits BR-Smads phosphorylation by type I BMP receptors, revealed the implication of this pathway in *IDs* transcription during this process. Furthermore, DM treatment specifically reduced the expression of the inhibitory molecules PD-L1 and PD-L2 which resulted in a higher ability of DCs to stimulate CD4⁺ T cell and NK cell activation. This is in accordance with previous works showing that prevention of PD-L1/2 interaction with their receptor PD-1 increases the response of lymphocytes induced by DCs^{57,58}. Silencing of the *IRF1* gene proved that PD-L1/2 expression by DCs was dependent on the upregulation of this transcription factor, as it was suggested in a different system by other authors⁵⁹. The fact that IRF1 expression resulted profoundly impaired by the presence of DM, and that its transcription was upregulated and downregulated after iDCs treatment with BMP-4 or DM, respectively, indicate that this gene could be a target gene of BMP signaling. Very similar results were observed as well in peripheral blood conventional DCs (cDCs), which implies that the regulation of PD-L1 and PD-L2 expression induced by proinflammatory cytokines through the axis BMP signaling/IRF1 is a mechanism shared by different DC populations.

One of the features of DCs is their capacity to communicate with different cells of the immune system, such as T cells, through transmembrane proteins and secreted factors⁶⁰. Thus, there was a possibility that the BMP ligands secreted by DCs could be acting on T cells during DC-T cell crosstalk. Our results show that CD3/CD28-activated naive CD4⁺ T cells respond to BMP-4 stimulation and, moreover, that the presence of both BMP-2 and BMP-4 throughout this process increases their proliferative response and cytokine production. In a comparable manner, expression of BMPRIA on CD4⁺ T cells was induced by their culture with allogeneic mDCs and the presence in the cell membrane of this receptor was closely associated with an enhanced proliferative

response. To address the possible role played by the BMP pathway during DC-induced activation of T cells, co-cultures were supplemented with DMH1, a new and improved inhibitor of the canonical BMP signaling⁶¹. As it was expected, DMH1 treatment dramatically affected T cell proliferation and IL-2 and IFN γ production, being these effects more severe within the first days of culture. Our observations are in line with other works presenting beneficial effects for BMP stimulation^{29,62}, and detrimental for BMP signaling blockade³¹, on the activation of CD4⁺ T cells.

CONCLUSIONS

Our work shows that DCs respond to BMP stimulation by increasing their survival and by the acquirement of a number of mature features, which could play a role in the initiation and development of certain pathologies associated with aberrant BMP ligand expression. In addition, blockade of the BMP pathway during DC maturation provokes the enhancement of the capacity of the resulting mDCs to stimulate both T cells and NK cells. These data offer a new possibility for modulating DC immunogenicity in order to improve the efficacy of current DC-based vaccines. Eventually, this is the first time that BMP signaling is involved in DC-T cell crosstalk in humans, a new window that could be of importance in the comprehension of this interaction during the induction of central tolerance and adaptive immunity.

1. Bragdon, B., Moseychuk, O., Saldanha, S., King, D., Julian, J. & Nohe, A. *Bone morphogenetic proteins: a critical review. Cell Signal* 23, 609-620 (2011).
2. Urist, M.R. *Bone: formation by autoinduction. Science* 150, 893-899 (1965).
3. Massague, J. & Chen, Y.G. *Controlling TGF-beta signaling. Genes Dev* 14, 627-644 (2000).
4. Sieber, C., Kopf, J., Hiepen, C. & Knaus, P. *Recent advances in BMP receptor signaling. Cytokine Growth Factor Rev* 20, 343-355 (2009).
5. Miyazono, K., Kamiya, Y. & Morikawa, M. *Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. J Biochem* 147, 35-51 (2010).
6. Derynck, R. & Zhang, Y.E. *Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. Nature* 425, 577-584 (2003).
7. Miyazono, K., Maeda, S. & Imamura, T. *BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. Cytokine Growth Factor Rev* 16, 251-263 (2005).
8. Hollnagel, A., Oehlmann, V., Heymer, J., Ruther, U. & Nordheim, A. *Id genes are direct targets of bone morphogenetic protein induction in embryonic stem cells. J Biol Chem* 274, 19838-19845 (1999).
9. Miyazono, K. & Miyazawa, K. *Id: a target of BMP signaling. Sci STKE* 2002, pe40 (2002).
10. Ito, Y. & Miyazono, K. *RUNX transcription factors as key targets of TGF-beta superfamily signaling. Curr Opin Genet Dev* 13, 43-47 (2003).
11. Leboy, P., Grasso-Knight, G., D'Angelo, M., Volk, S.W., Lian, J.V., Drissi, H., Stein, G.S. & Adams, S.L. *Smad-Runx interactions during chondrocyte maturation. J Bone Joint Surg Am* 83-A Suppl 1, S15-22 (2001).
12. Lee, Y.S. & Chuong, C.M. *Activation of protein kinase A is a pivotal step involved in both BMP-2- and cyclic AMP-induced chondrogenesis. J Cell Physiol* 170, 153-165 (1997).

13. Lemonnier, J., Ghayor, C., Guicheux, J. & Caverzasio, J. *Protein kinase C-independent activation of protein kinase D is involved in BMP-2-induced activation of stress mitogen-activated protein kinases JNK and p38 and osteoblastic cell differentiation.* *J Biol Chem* 279, 259-264 (2004).
14. Sugimori, K., Matsui, K., Motomura, H., Tokoro, T., Wang, J., Higa, S., Kimura, T. & Kitajima, I. *BMP-2 prevents apoptosis of the N1511 chondrocytic cell line through PI3K/Akt-mediated NF-kappaB activation.* *J Bone Miner Metab* 23, 411-419 (2005).
15. Shim, J.H., Greenblatt, M.B., Xie, M., Schneider, M.D., Zou, W., Zhai, B., Gygi, S. & Glimcher, L.H. *TAK1 is an essential regulator of BMP signalling in cartilage.* *EMBO J* 28, 2028-2041 (2009).
16. Zhao, G.Q. *Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse.* *Genesis* 35, 43-56 (2003).
17. Beppu, H., Kawabata, M., Hamamoto, T., Chytil, A., Minowa, O., Noda, T. & Miyazono, K. *BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos.* *Dev Biol* 221, 249-258 (2000).
18. Hogan, B.L. *Bone morphogenetic proteins in development.* *Curr Opin Genet Dev* 6, 432-438 (1996).
19. Mishina, Y., Suzuki, A., Ueno, N. & Behringer, R.R. *Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis.* *Genes Dev* 9, 3027-3037 (1995).
20. Pignolo, R.J., Shore, E.M. & Kaplan, F.S. *Fibrodysplasia ossificans progressiva: diagnosis, management, and therapeutic horizons.* *Pediatr Endocrinol Rev* 10 Suppl 2, 437-448 (2013).
21. Lories, R.J. & Luyten, F.P. *Bone morphogenetic protein signaling and arthritis.* *Cytokine Growth Factor Rev* 20, 467-473 (2009).
22. Voumvourakis, K.I., Antonelou, R., Kitsos, D.K., Stamboulis, E. & Tsiodras, S. *TGF-beta/BMPs: crucial crossroad in neural autoimmune disorders.* *Neurochem Int* 59, 542-550 (2011).
23. Rosendahl, A., Pardali, E., Speletas, M., Ten Dijke, P., Heldin, C.H. & Sideras, P. *Activation of bone morphogenetic protein/Smad signaling in bronchial epithelial cells during airway inflammation.* *Am J Respir Cell Mol Biol* 27, 160-169 (2002).
24. Cai, J., Pardali, E., Sanchez-Duffhues, G. & ten Dijke, P. *BMP signaling in vascular diseases.* *FEBS Lett* 586, 1993-2002 (2012).
25. Singh, A. & Morris, R.J. *The Yin and Yang of bone morphogenetic proteins in cancer.* *Cytokine Growth Factor Rev* 21, 299-313 (2010).
26. Marks-Bluth, J. & Pimanda, J.E. *Cell signalling pathways that mediate haematopoietic stem cell specification.* *Int J Biochem Cell Biol* 44, 2175-2184 (2012).
27. Cejalvo, T., Sacedon, R., Hernandez-Lopez, C., Diez, B., Gutierrez-Frias, C., Valencia, J., Zapata, A.G., Varas, A. & Vicente, A. *Bone morphogenetic protein-2/4 signalling pathway components are expressed in the human thymus and inhibit early T-cell development.* *Immunology* 121, 94-104 (2007).
28. Varas, A., Sacedon, R., Hidalgo, L., Martinez, V.G., Valencia, J., Cejalvo, T., Zapata, A., Hernandez-Lopez, C. & Vicente, A. *Interplay between BMP4 and IL-7 in human intrathymic precursor cells.* *Cell Cycle* 8, 4119-4126 (2009).
29. Lu, L., Ma, J., Wang, X., Wang, J., Zhang, F., Yu, J., He, G., Xu, B., Brand, D.D., Horwitz, D.A., Shi, W. & Zheng, S.G. *Synergistic effect of TGF-beta superfamily members on the induction of Foxp3+ Treg.* *Eur J Immunol* 40, 142-152 (2010).
30. Takai, S., Tokuda, H., Matsushima-Nishiwaki, R., Saio, M., Takami, T. & Kozawa, O. *TGF-beta superfamily enhances the antigen-induced IFN-gamma production by effector/memory CD8+ T cells.* *Int J Mol Med* 25, 105-111 (2010).
31. Yoshioka, Y., Ono, M., Osaki, M., Konishi, I. & Sakaguchi, S. *Differential effects of inhibition of bone morphogenetic protein (BMP) signalling on T-cell activation and differentiation.* *Eur J Immunol* 42, 749-759 (2012).
32. Kersten, C., Dosen, G., Myklebust, J.H., Sivertsen, E.A., Hystad, M.E., Smeland, E.B. & Rian, E. *BMP-6 inhibits human bone marrow B lymphopoiesis--upregulation of Id1 and Id3.* *Exp Hematol* 34, 72-81 (2006).
33. Zetterblad, J., Qian, H., Zandi, S., Mansson, R., Lagergren, A., Hansson, F., Bryder, D., Paulsson, N. & Sigvardsson, M. *Genomics based analysis of interactions between developing B-lymphocytes and stromal cells reveal complex interactions and two-way communication.* *BMC Genomics* 11, 108 (2010).

34. Huse, K., Bakkebo, M., Oksvold, M.P., Forfang, L., Hilden, V.I., Stokke, T., Smeland, E.B. & Myklebust, J.H. *Bone morphogenetic proteins inhibit CD40L/IL-21-induced Ig production in human B cells: differential effects of BMP-6 and BMP-7.* *Eur J Immunol* 41, 3135-3145 (2011).
35. Kersten, C., Sivertsen, E.A., Hystad, M.E., Forfang, L., Smeland, E.B. & Myklebust, J.H. *BMP-6 inhibits growth of mature human B cells; induction of Smad phosphorylation and upregulation of Id1.* *BMC Immunol* 6, 9 (2005).
36. Tsalavos, S., Segklia, K., Passa, O., Petryk, A., O'Connor, M.B. & Graf, D. *Involvement of twisted gastrulation in T cell-independent plasma cell production.* *J Immunol* 186, 6860-6870 (2011).
37. Hidalgo, L., Martinez, V.G., Valencia, J., Hernandez-Lopez, C., Vazquez, M.N., Nunez, J.R., Zapata, A.G., Sacedon, R., Varas, A. & Vicente, A. *Expression of BMPRIA on human thymic NK cell precursors: role of BMP signaling in intrathymic NK cell development.* *Blood* 119, 1861-1871 (2012).
38. Perron, J.C. & Dodd, J. *ActRIIA and BMPRII Type II BMP receptor subunits selectively required for Smad4-independent BMP7-evoked chemotaxis.* *PLoS One* 4, e8198 (2009).
39. Cunningham, N.S., Paralkar, V. & Reddi, A.H. *Osteogenin and recombinant bone morphogenetic protein 2B are chemotactic for human monocytes and stimulate transforming growth factor beta 1 mRNA expression.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11740-11744 (1992).
40. Fong, D., Bisson, M., Laberge, G., McManus, S., Grenier, G., Fauchoux, N. & Roux, S. *Bone morphogenetic protein-9 activates Smad and ERK pathways and supports human osteoclast function and survival in vitro.* *Cell Signal* 25, 717-728 (2013).
41. Maurer, T., Zimmermann, G., Maurer, S., Stegmaier, S., Wagner, C. & Hansch, G.M. *Inhibition of osteoclast generation: a novel function of the bone morphogenetic protein 7/osteogenic protein 1.* *Mediators Inflamm* 2012, 171209 (2012).
42. Bhat, A., Wooten, R.M. & Jayasuriya, A.C. *Secretion of growth factors from macrophages when cultured with microparticles.* *J Biomed Mater Res A* 101, 3170-3180 (2013).
43. Chung, J.H., Jeon, H.J., Hong, S.Y., Lee da, L., Lee, K.H., Kim, S.H., Han, Y.S., Manabe, I., Miller, Y.I. & Lee, S.H. *Palmitate promotes the paracrine effects of macrophages on vascular smooth muscle cells: the role of bone morphogenetic proteins.* *PLoS One* 7, e29100 (2012).
44. Hong, J.H., Lee, G.T., Lee, J.H., Kwon, S.J., Park, S.H., Kim, S.J. & Kim, I.Y. *Effect of bone morphogenetic protein-6 on macrophages.* *Immunology* 128, e442-450 (2009).
45. Lee, G.T., Jung, Y.S., Lee, J.H., Kim, W.J. & Kim, I.Y. *Bone morphogenetic protein 6-induced interleukin-1beta expression in macrophages requires PU.1/Smad1 interaction.* *Mol Immunol* 48, 1540-1547 (2011).
46. Lee, G.T., Kwon, S.J., Lee, J.H., Jeon, S.S., Jang, K.T., Choi, H.Y., Lee, H.M., Kim, W.J., Kim, S.J. & Kim, I.Y. *Induction of interleukin-6 expression by bone morphogenetic protein-6 in macrophages requires both SMAD and p38 signaling pathways.* *J Biol Chem* 285, 39401-39408 (2010).
47. Xia, Y., Cortez-Retamozo, V., Niederkofer, V., Salie, R., Chen, S., Samad, T.A., Hong, C.C., Arber, S., Vyas, J.M., Weissleder, R., Pittet, M.J. & Lin, H.Y. *Dragon (repulsive guidance molecule b) inhibits IL-6 expression in macrophages.* *J Immunol* 186, 1369-1376 (2011).
48. Steinman, R.M. & Cohn, Z.A. *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution.* *J Exp Med* 137, 1142-1162 (1973).
49. Steinman, R.M. & Cohn, Z.A. *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro.* *J Exp Med* 139, 380-397 (1974).
50. Abhishek, K., Kumar, R., Arif, E., Patra, P.K., Choudhary, S.B. & Sohail, M. *Induced expression of bone morphogenetic protein-6 and Smads signaling in human monocytes derived dendritic cells during sickle-cell pathology with orthopedic complications.* *Biochem Biophys Res Commun* 396, 950-955 (2010).
51. Pluchino, S., Zannotti, L., Brambilla, E., Rovere-Querini, P., Capobianco, A., Alfaro-Cervello, C., Salani, G., Cossetti, C., Borsellino, G., Battistini, L., Ponzoni, M., Doglioni, C., Garcia-Verdugo, J.M., Comi, G., Manfredi, A.A. & Martino, G. *Immune regulatory neural stem/precursor cells protect from central nervous system autoimmunity by restraining dendritic cell function.* *PLoS One* 4, e5959 (2009).
52. Dominguez-Soto, A., Relloso, M., Vega, M.A., Corbi, A.L. & Puig-Kroger, A. *RUNX3 regulates the activity of the CD11a and CD49d integrin gene promoters.* *Immunobiology* 210, 133-139 (2005).
53. Fainaru, O., Shseyov, D., Hantisteanu, S. & Groner, Y. *Accelerated chemokine receptor 7-mediated dendritic cell migration in Runx3 knockout mice and the spontaneous development of asthma-like disease.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 10598-10603 (2005).

54. Fainaru, O., Woolf, E., Lotem, J., Yarmus, M., Brenner, O., Goldenberg, D., Negreanu, V., Bernstein, Y., Levanon, D., Jung, S. & Groner, Y. *Runx3 regulates mouse TGF-beta-mediated dendritic cell function and its absence results in airway inflammation. EMBO J* 23, 969-979 (2004).
55. Puig-Kroger, A., Aguilera-Montilla, N., Martinez-Nunez, R., Dominguez-Soto, A., Sanchez-Cabo, F., Martin-Gayo, E., Zaballos, A., Toribio, M.L., Groner, Y., Ito, Y., Dopazo, A., Corcuera, M.T., Alonso Martin, M.J., Vega, M.A. & Corbi, A.L. *The novel RUNX3/p33 isoform is induced upon monocyte-derived dendritic cell maturation and downregulates IL-8 expression. Immunobiology* 215, 812-820 (2010).
56. Rankin, L. & Belz, G.T. *Diverse roles of inhibitor of differentiation 2 in adaptive immunity. Clin Dev Immunol* 2011, 281569 (2011).
57. Benson, D.M., Jr., Bakan, C.E., Mishra, A., Hofmeister, C.C., Efebera, Y., Becknell, B., Baiocchi, R.A., Zhang, J., Yu, J., Smith, M.K., Greenfield, C.N., Porcu, P., Devine, S.M., Rotem-Yehudar, R., Lozanski, G., Byrd, J.C. & Caligiuri, M.A. *The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. Blood* 116, 2286-2294 (2010).
58. Brown, J.A., Dorfman, D.M., Ma, F.R., Sullivan, E.L., Munoz, O., Wood, C.R., Greenfield, E.A. & Freeman, G.J. *Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. J Immunol* 170, 1257-1266 (2003).
59. Lee, S.J., Jang, B.C., Lee, S.W., Yang, Y.I., Suh, S.I., Park, Y.M., Oh, S., Shin, J.G., Yao, S., Chen, L. & Choi, I.H. *Interferon regulatory factor-1 is prerequisite to the constitutive expression and IFN-gamma-induced upregulation of B7-H1 (CD274). FEBS Lett* 580, 755-762 (2006).
60. Reis e Sousa, C. *Dendritic cells in a mature age. Nat Rev Immunol* 6, 476-483 (2006).
61. Hao, J., Ho, J.N., Lewis, J.A., Karim, K.A., Daniels, R.N., Gentry, P.R., Hopkins, C.R., Lindsley, C.W. & Hong, C.C. *In vivo structure-activity relationship study of dorsomorphin analogues identifies selective VEGF and BMP inhibitors. ACS Chem Biol* 5, 245-253 (2010).
62. Varas A., M.V., Hernández-López C., Hidalgo L., Entrena A., Valencia J., Zapata A., Sacedón R., Vicente A. *Role of BMP signalling in peripheral CD4+ T cell proliferation. Inmunología* 28, 125-130 (2009).

ANEXO

**Autocrine activation of canonical BMP signalling regulates
PD-L1 and PD-L2 expression in human dendritic cells**

Journal:	<i>European Journal of Immunology</i> - 2
Manuscript ID:	ej.201343693.R1
Wiley - Manuscript type:	Short Communication
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Martínez, Víctor; Faculty of Medicine, Complutense University, Cell Biology Hidalgo, Laura; Faculty of Medicine, Complutense University, Cell Biology Valencia, Jaris; Faculty of Medicine, Complutense University, Cell Biology Hernández-López, Carmen; Faculty of Medicine, Complutense University, Cell Biology Entrena, Ana; Faculty of Medicine, Complutense University, Cell Biology del Amo, Beatriz; Faculty of Medicine, Complutense University, Cell Biology Zapata, Agustín; Faculty of Biology, Complutense University, Cell Biology Vicente, Angeles; Faculty of Medicine, Complutense University, Cell Biology Sacedón, Rosa; Faculty of Medicine, Complutense University, Cell Biology Varas, Alberto; Faculty of Medicine. Complutense University, Cell Biology
Keywords:	Bone Morphogenetic Proteins, Dendritic cells, Dorsomorphin, PD-L1, PD-L2

SCHOLARONE™
Manuscripts

Autocrine activation of canonical BMP signalling regulates PD-L1 and PD-L2 expression in human dendritic cells

Víctor G. Martínez¹, Laura Hidalgo¹, Jaris Valencia¹, Carmen Hernández-López¹, Ana Entrena¹, Beatriz G. del Amo¹, Agustín G. Zapata², Angeles Vicente¹, Rosa Sacedón^{1,*} and Alberto Varas^{1,*}

¹ Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, 28040 Madrid, Spain

² Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, Spain

* These authors have contributed equally to this work

Correspondence: Dr. Alberto Varas, Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, 28040 Madrid, Spain. Phone: 34-91-3941407. Fax: 34-91-3941396. E-mail: avaras@bio.ucm.es

Keywords: Bone Morphogenetic Proteins / Dendritic cells / Dorsomorphin / PD-L1 / PD-L2

Abbreviations: BMP, bone morphogenetic proteins; BR-Smads, BMP receptor-regulated Smads; cDCs, conventional dendritic cells; DM, dorsomorphin; MoDCs, monocyte-derived dendritic cells

ORIGINAL ARTICLE

The canonical BMP signaling pathway is involved in human monocyte-derived dendritic cell maturation

Víctor G Martínez¹, Carmen Hernández-López¹, Jaris Valencia¹, Laura Hidalgo¹, Ana Entrena¹, Agustín G Zapata², Angeles Vicente¹, Rosa Sacedón^{1,3} and Alberto Varas^{1,3}

Bone morphogenetic proteins (BMPs), members of the transforming growth factor- β superfamily, are multifunctional polypeptides regulating a broad spectrum of functions in embryonic and adult tissues. Recent reports have demonstrated that BMPs regulate the survival, proliferation and differentiation of several cell types in the immune system. In this study, we investigate the effects of BMP signaling activation on the capacity of human dendritic cells (DCs) to stimulate immune responses. Human DCs express type I and type II BMP receptors (BMPRIA, BMPRIB, type IA activin receptor, BMPRII) and BMP signal transduction molecules (Smad1, 5, and 8, as well as Smad4). On BMP stimulation, Id1–3 (inhibitor of differentiation 1–3/DNA binding) mRNA expression is upregulated and this effect can be blocked with the inhibitor dorsomorphin, showing that the canonical BMP signal transduction pathway is functionally active in DCs. BMP signaling activation promotes the phenotypic maturation of human DCs by increasing the expression of co-stimulatory molecules and also CD83, programmed cell death ligand 1 (PD-L1) and PD-L2, and stimulates cytokine secretion, mainly interleukin-8 and tumor necrosis factor- α . Accordingly, BMP-treated DCs exhibit an enhanced T-cell stimulatory capacity. BMP signaling also enhances the survival of human DCs increasing the Bcl-2/Bax ratio. Finally, the expression of Runx transcription factors is increased in mature DCs, and the mRNA levels of Runx1–3 are upregulated in response to BMP stimulation, indicating that Runx transcription factor family may mediate the effects of BMP signaling in human DC maturation.

Immunology and Cell Biology (2011) 89, 610–618; doi:10.1038/icb.2010.135; published online 23 November 2010

Keywords: bone morphogenetic proteins; dendritic cells; dorsomorphin; Id proteins; Runx proteins

Bone morphogenetic proteins (BMPs) constitute a large subgroup of secreted signaling proteins that belong to the transforming growth factor (TGF)- β superfamily.¹ BMPs are synthesized as large precursor molecules, which are proteolytically cleaved to release the mature proteins. The active forms usually consist of homodimers that can initiate signaling by binding to heteromeric complexes constituted by transmembrane receptors, termed type I and type II, exhibiting serine/threonine kinase activity. The type II BMP receptor (BMPRII) combined with one of the following type I receptors: type IA BMP receptor (BMPRIA)/ALK-3, type IB BMP receptor (BMPRIB)/ALK-6 and type IA activin receptor (ActRIA)/ALK-2, are the most common components of BMP receptors. The constitutively active type II receptors phosphorylate type I receptors on ligand binding, and the activated type I receptors subsequently phosphorylate downstream targets of at least two signaling cascades.^{1–3} The canonical BMP signaling pathway involves the Smad protein family. Specifically, the BMP receptor-regulated Smads (BR-Smads), Smad1, Smad5 and Smad8, are phosphorylated and activated by type I BMP receptors. Once phosphorylated, BR-Smads dissociate from the receptors, form complexes with Smad4, translocate into the nucleus, bind to BMP

responsive elements and function as transcriptional co-modulators to induce or repress BMP target gene expression.^{1,2} The members of the Id (inhibitor of differentiation/DNA binding) protein family, a class of helix–loop–helix proteins, have been shown to be important targets for BMP signaling.^{1,4} In addition to the canonical Smad-dependent signaling pathway, the activated receptor complexes may initiate a non-canonical Smad-independent pathway leading to activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK).^{1,3}

BMPs were originally identified as growth and differentiation factors for osteogenic cells,⁵ and are now considered as multifunctional polypeptides.⁶ BMPs have key roles in the development of many organs and also function in adult tissues.^{1,3,7,8} In the immune system, BMP6 inhibits the proliferation of human B cell progenitors as well as mature B cells through the Smad-dependent pathway.^{9,10} Likewise, different members of BMP family have been demonstrated to have anti-proliferative and pro-apoptotic effects in multiple myeloma cells.^{11,12} We and others have shown that BMP2, BMP4 and BMP7 are the main ligands expressed in the human and murine thymus.^{13–15} BMP4 enhances the survival of thymocyte precursors and inhibits their proliferation.^{15,16} Also, BMP4 arrests early T-cell

¹Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain and ²Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain
³These authors contributed equally to this work.

Correspondence: Dr A Varas, Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid 28040, Spain.

E-mail: avaras@bio.ucm.es

Received 25 May 2010; revised 8 October 2010; accepted 14 October 2010; published online 23 November 2010

Role of BMP signalling in peripheral CD4⁺ T cell proliferation

Alberto Varas, Víctor G. Martínez, Carmen Hernández-López, Laura Hidalgo, Ana Entrena, Jaris Valencia, Agustín Zapata, Rosa Sacedón, Angeles Vicente

Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid.

PAPEL DE LA SEÑALIZACIÓN BMP EN LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS T CD4⁺ PERIFÉRICAS

Recibido: 6 Septiembre 2009

Aceptado: 18 Septiembre 2009

RESUMEN

Las Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMPs) desempeñan un papel clave durante la embriogénesis y organogénesis de vertebrados, y también se ha descrito que llevan a cabo diversas funciones en tejidos adultos con capacidad auto-renovadora. Varios trabajos han demostrado que distintas BMPs están implicadas en el control de la proliferación de diferentes tipos celulares hematopoyéticos. En este estudio nosotros evidenciamos que las células T CD4⁺ periféricas de ratón expresan los tres tipos de receptores tipo I de BMP (BMPRIA, BMPRIB, ActRIA), y que la proporción de células T que expresan los receptores para BMPs incrementa notablemente tras estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD3 más anti-CD28. La vía de señalización BMP es funcional en estas células T CD4⁺ periféricas puesto que al cultivarlas en presencia de BMP4 se incrementan los niveles de Smad1 fosforilada. Además, nuestros resultados demuestran que la adición de BMP2 y BMP4 durante la estimulación con anti-CD3/CD28 modula de manera diferencial la proliferación de las células T CD4⁺. En conjunto, los resultados indican que la vía de señalización BMP juega un papel en las respuestas de células T.

PALABRAS CLAVE: Proteínas morfogenéticas óseas / Linfocitos T / Proliferación celular.

ABSTRACT

Bone morphogenetic proteins (BMPs) play a key role during vertebrate embryogenesis and organogenesis, and have also been described to function in self-renewing tissues in adults. Several reports have demonstrated that distinct BMPs are involved in the control of the proliferation of different hematopoietic cell types. In this study, we provide evidence that murine peripheral CD4⁺ T cells express the three type I BMP receptors (BMPRIA, BMPRIB, ActRIA), and the proportions of BMP-expressing T cells increases notably after both anti-CD3 and anti-CD3/CD28 stimulation. The BMP signalling pathway is functional in peripheral CD4⁺ T lymphocytes since the culture of CD4⁺ T cells in the presence of BMP4 increases the levels of phosphorylated Smad1. In addition, our results show that the addition of BMP2 and BMP4 during anti-CD3/CD28 stimulation differentially modulates the proliferation of CD4⁺ T cells. Altogether, the data indicate a role for the signalling pathway of BMP in T cell responses.

KEY WORDS: Bone Morphogenetic Proteins / T cells / Cell Proliferation.

INTRODUCTION

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are secreted signalling proteins, which form a subgroup of the TGF- β superfamily⁽¹⁾. BMPs initiate signalling by binding to a heteromeric complex constituted by type I and type II serine/threonine kinase receptors. Type II receptors are constitutively active kinases, which transphosphorylate type I receptors upon ligand binding. Type I receptors activate intracellular substrates by phosphorylation, and thus determine the specificity of intracellular signals. The main BMP receptors are constituted by the combination of type II BMP receptor (BMPRII) and the following type I receptors: type IA BMP receptor (BMPRIA)/ALK-3, type IB BMP receptor (BMPRII)/ALK-6, and type IA Activin receptor (ActRIA)/ALK-2⁽²⁻⁶⁾. BMP signal transduction to the nucleus is mediated by proteins of the Smad family.

Specifically, Smad1, Smad5 and Smad8 (also called BMP receptor-regulated Smads or BR-Smads) are phosphorylated and activated by type I BMP receptors. BR-Smads then form complexes with Smad-4, which translocate into the nucleus where they regulate gene expression⁽⁵⁻⁷⁾. In addition to this canonical Smad-dependent signalling pathway, BMP receptors may activate a non-canonical Smad-independent pathway leading to phosphorylation of p38⁽⁸⁾.

BMPs were originally identified by their ability to induce ectopic cartilage and bone formation⁽⁹⁾. Nevertheless, it has been shown that BMPs also regulate cell proliferation, differentiation and apoptosis during embryogenesis⁽¹⁰⁾, and also in adult self-renewing tissues, such as the hematopoietic and immune systems. Different BMPs have been demonstrated to participate in the control of the expansion and differentiation of hematopoietic precursor cells, in synergy with several cytokines⁽¹¹⁻¹³⁾. BMP6 inhibits the growth of human B cell progenitors and mature B lymphocytes^(14,15), and several BMPs have been shown to have anti-proliferative and pro-apoptotic effects in multiple myeloma cells^(16,17). We and others have demonstrated the expression of BMP2 and BMP4 in the thymus, where these BMP ligands are involved in regulating proliferation, survival and differentiation during early T-cell development⁽¹⁸⁻²⁰⁾.

The expression of BMP receptors has been reported in lymphoblastoid cell lines as well as in the Jurkat TAG cell line, whose proliferation is inhibited in the presence of BMP6^(21,22). We describe in this study the expression of functional BMP receptors in peripheral murine CD4⁺ T lymphocytes and the modulation of T cell proliferation by BMP2 and BMP4.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Young adult BALB/c mice (4-6 weeks old) were purchased from Harlan Ibérica (Barcelona, Spain) and maintained under pathogen-free conditions. Experiments were performed according to institutional guidelines and were approved by the Complutense University Ethical Committee for Animal Experimentation.

Flow cytometry

The following mAb conjugated with FITC, PE, Cychrome or APC were used for flow cytometric analysis: CD4 (RM4-5), CD25 (PC61), and CD69 (H1.2F3) from BD Biosciences (San José, CA). The extracellular domains of BMP receptors were detected with PE-conjugated anti-BMPRIA (E-16) and anti-BMPRII (N-17) antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), FITC-conjugated anti-BMPRIA antibodies (R&D Systems, Minneapolis, MN), and unconjugated anti-ActRIA antibodies (R&D Systems), followed by fluorochrome-conjugated, multiadsorbed F(ab')₂ fragments of donkey anti-goat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories; West Grove, PA). Two- and three-color immunofluorescence stainings were performed by incubating the cells in PBS containing 1% FCS and 0.1% NaN₃ in the presence of saturating amounts of fluorochrome-conjugated antibodies for 30 min at 4°C. For the intracellular stainings of phosphorylated Smad1, and according to the manufacturer's instructions, cells were treated with Cytotfix/Cytoperm solution (BD Biosciences) for 20 min at 4°C, washed with Perm/Wash buffer (BD Biosciences), and stained with anti-phospho-Smad1 (Ser463/Ser465) (Santa Cruz Biotechnology) followed by fluorochrome-conjugated, multiadsorbed F(ab')₂ fragments of donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories), all diluted in Perm/Wash buffer. Analyses were conducted in a FACSCalibur flow cytometer (Centro de Microscopía y Citometría, Complutense University of Madrid).

Proliferation assays

Naive CD4⁺ T cells were isolated from lymph nodes by magnetic sorting using a negative selection protocol (Miltenyi Biotech, Bergisch, Germany). Isolated CD4⁺ T cells ($1-2 \times 10^5$) were cultured in 96-well flat-bottom culture plates in AIM-V serum-free medium (Invitrogen, Grand Island, NY) and stimulated with immobilized anti-CD3 (3 μ g/ml) with or without anti-CD28 (1 μ g/ml) mAb (BD Biosciences). In some cultures different doses (1-300 ng/ml) of rhBMP4 (R&D Systems) and rhBMP2 (RDI Research Diagnostics, Flanders, NJ) were added. At different time points, cultures

were pulsed for 12 h with 10 μ M 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU). A specific kit from Roche Diagnostics (Barcelona, Spain), BrdU Labeling and Detection Kit III, was used to measure BrdU incorporation into newly synthesized DNA. Briefly, the labeling medium was removed, and cells were dried (2 h at 60 °C), fixed in ethanol in HCl (0.5 M) for 30 min at -20°C, treated with nucleases (30 min at 37°C), and then incubated with peroxidase-conjugated Fab fragments of mouse anti-BrdU (30 min at 37°C). The peroxidase reaction was developed with ABTS substrate, and the sample absorbance was measured using an ELISA reader (ELX800MB, Bio-Teck Instruments, VT) at 405 nm with a reference wavelength at 492 nm.

RESULTS

Expression of a functional BMP signalling pathway in peripheral CD4⁺ T cells

To determine whether murine CD4⁺ T cells are targets for BMP, the cell surface expression of BMP receptors was analyzed by flow cytometry. As shown in Figure 1A, about 6-8% of naive resting CD4⁺ T cells expressed the three type I BMP receptors, BMPRIA, BMPRIB and ActRIA. Next, naive CD4⁺ T cells were isolated from lymph nodes, stimulated with immobilized anti-CD3 mAb with or without anti-CD28 mAb, and the BMP receptor expression was analyzed at different time points. Figure 1B shows that both anti-CD3 and anti-CD3/CD28 stimulations induced a similar up-regulation of BMP receptor expression. Activated CD4⁺ T cells up-regulated BMPRIA expression at 72 h, whereas BMPRIB and ActRIA expression was clearly up-regulated at 48h, increasing the proportion of positive cells at 72 h (Figure 1B). After 48 h of stimulation, BMP receptor-bearing T cells mostly express CD69, and about 60% express CD25 (data not shown).

To demonstrate that the BMP signalling pathway is active in CD4⁺ T cells, we studied the effect of BMP addition on Smad1 phosphorylation. Smad1 is a receptor regulated Smad, directly phosphorylated and functionally activated by the BMP receptor upon ligand binding⁽²³⁾. The levels of phosphorylated Smad1 notably increased when CD4⁺ T cells were cultured in the presence of BMP4 after stimulation with anti-CD3/CD28 mAb for 48 h (Figure 1C). In addition, we showed that the expression of phosphorylated Smad1 was associated with activated CD4⁺ CD25⁺ T cells (Figure 1C).

BMP influences CD4⁺ T cell proliferation

Given that the BMP signalling pathway is functionally active in peripheral CD4⁺ T cells and has been also involved

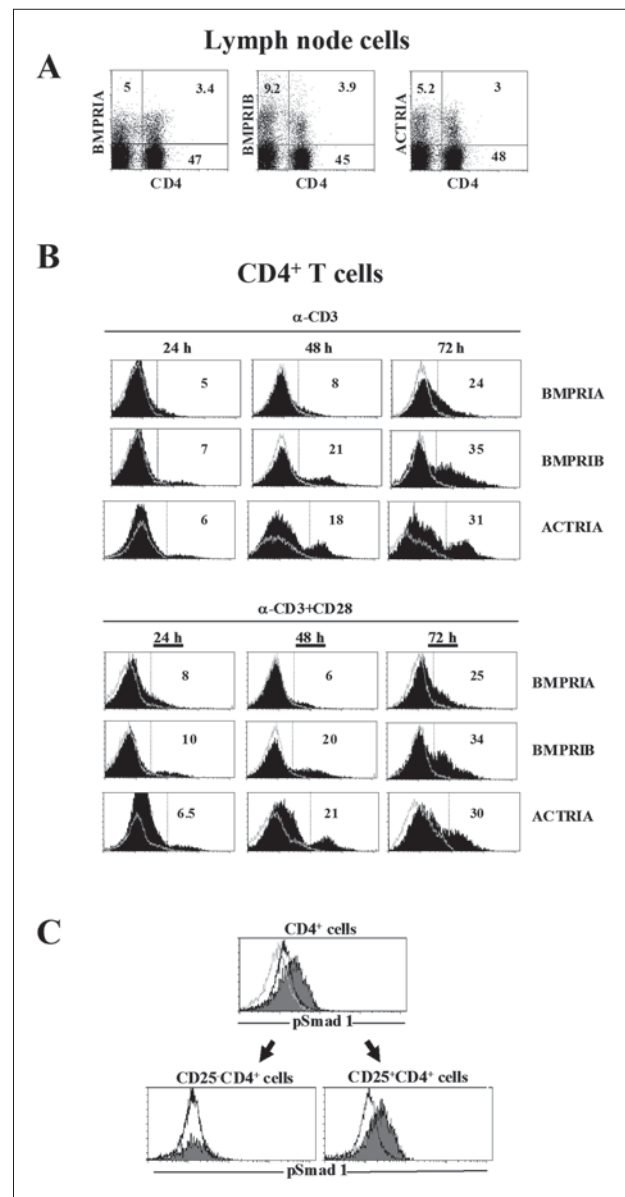


Figure 1. Peripheral CD4⁺ T cells express functional BMP receptors. A) Dot plots show the expression of CD4 vs type I BMP receptors (BMPRIA, BMPRIB and ActRIA) on murine lymph node cells. B) CD4⁺ T cells were isolated from lymph nodes, and stimulated with anti-CD3 or anti-CD3 plus CD28 mAb for 24, 48 and 72 h. Black histograms show the expression of BMPRIA, BMPRIB and ActRIA on activated T cells. Grey lines indicate background staining. The percentages of positive cells are shown in each histogram. C) Isolated CD4⁺ T cells were stimulated with CD3/CD28 mAb for 48 h and after cultured in the absence (black lines) or presence (solid histograms) of BMP4 (100 ng/ml) for two more hours. The expression of CD4, CD25 and phosphorylated Smad1 was then analyzed. Grey lines indicate background staining.

in regulating the proliferation of several cell types^(11,12,14-17,22), we investigated whether BMP signalling modulates CD4⁺ T cell proliferation. Naive peripheral CD4⁺ T cells were

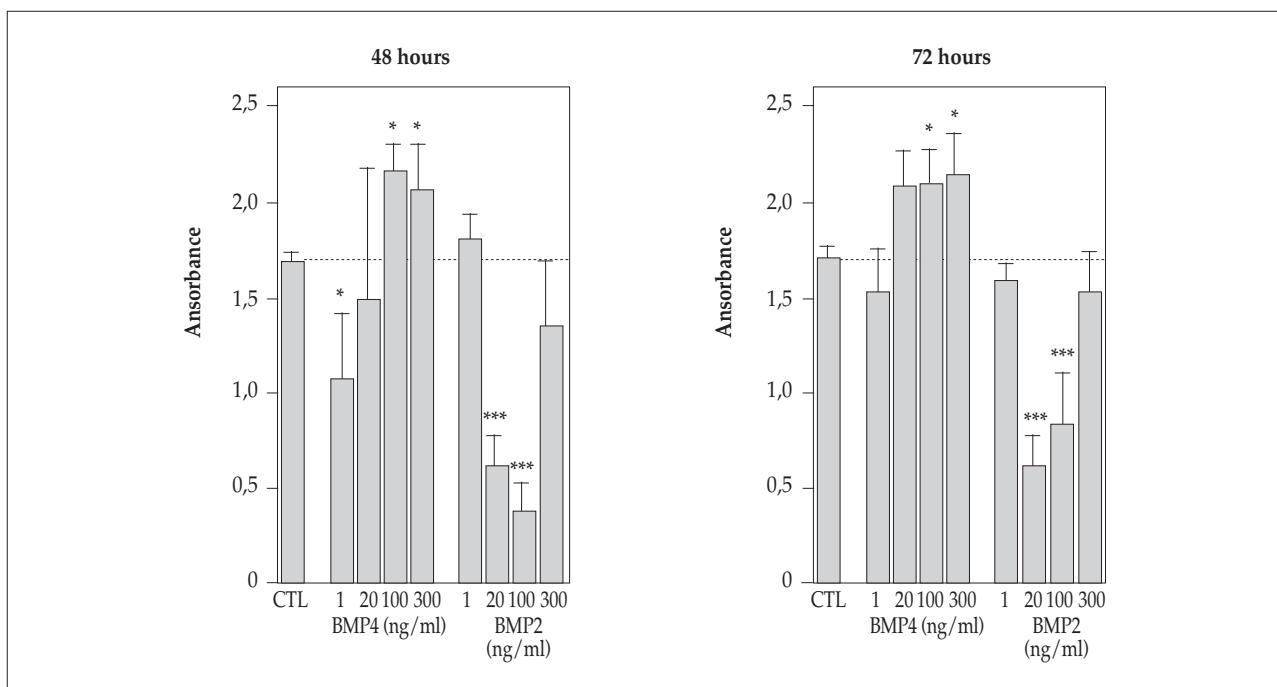


Figure 2. BMP2 and BMP4 influences CD4⁺ T cell proliferation. Isolated CD4⁺ T lymphocytes were stimulated with anti-CD3/CD28 in the absence or presence of different doses (1-300 ng/ml) of BMP2 and BMP4. After 48 and 72 h, T cell proliferation was analyzed by measuring BrdU incorporation into newly synthesized DNA, as described in Materials and Methods. Bars represent the mean (\pm SD) of three to four independent experiments (*, $p \leq 0.05$; ***, $p \leq 0.001$, by *t* test).

isolated and stimulated with anti-CD3/CD28 mAb for 48 and 72 h in the presence of different doses of BMP4 and BMP2, which we have previously shown that play an important role in T-cell differentiation in the murine thymus⁽²⁰⁾. Interestingly, the effects of the addition of BMP4 and BMP2 on CD4⁺ T cell proliferation were different. Low doses of BMP4 decreased the proliferative rate of CD4⁺ T lymphocytes, whereas the addition of medium to high doses of BMP4 significantly stimulated the proliferation over control values (Figure 2). On the contrary, the presence of medium BMP2 doses drastically inhibited the proliferative response of CD4⁺ T cells, whereas the addition of low and high doses of BMP2 hardly affected T-cell proliferation (Figure 2).

DISCUSSION

In this study we report the expression of a functionally active BMP signalling pathway in murine peripheral CD4⁺ T cells. Low numbers of naive CD4⁺ T cells express BMP receptors but the proportions of BMP receptor-expressing T cells increase notably after anti-CD3 and anti-CD3/CD28 stimulation. The increase in the levels of phosphorylated Smad1 after short-term culture with BMP4 demonstrates that the BMP pathway is functional in peripheral CD4⁺ T lymphocytes. In agreement with our results, de la Peña et

al.⁽²¹⁾ reported the expression of functional BMP receptors in lymphoblastoid cell lines established from human peripheral blood mononuclear cells. Likewise, Sivertsen et al.⁽²²⁾ showed that human Jurkat TAG cells as well as human peripheral blood CD4⁺ T cells, mostly with a CD45RO⁺ memory phenotype, express BMP receptors, and BMP6 stimulation of these cells led to Smad1/5/8 phosphorylation. However, the composition of the active BMP receptor complex expressed by T cells remains controversial. Our data indicate that the three type I BMP receptors are expressed similarly in both naive and activated CD4⁺ T lymphocytes, whereas BMPRIA is the main type I BMP receptor expressed by lymphoblastoid cell lines⁽²¹⁾ and ActRIA is largely expressed in Jurkat TAG cells and human peripheral blood CD4⁺ T cells⁽²²⁾. A differential BMP receptor expression in distinct T cell subpopulations and species-specific differences could account for the discrepancy between these results.

Our results indicate that the BMP signalling pathway plays a role in peripheral T lymphocytes mainly after activation via CD3/TCR, influencing, at least, T cell proliferation. Different reports have demonstrated that BMP ligands have the ability to modulate the proliferation of several hematopoietic cell types such as thymocytes⁽¹⁸⁻²⁰⁾, B lymphocytes^(14, 15), hematopoietic stem cells⁽¹¹⁻¹³⁾ and Jurkat TAG cells⁽²²⁾.

An interesting finding derived from this study is that BMP2 and BMP4 ligands differentially modulate T cell proliferation. BMP2 and BMP4 normally induce similar cellular responses^(24, 25), but differential effects of different doses of BMP4 compared with BMP2 have been also reported on human hematopoietic stem cells⁽¹¹⁾. Bathia and collaborators explained those results according to the possible existence of different cell subpopulations expressing different BMP receptors and/or regulatory intracellular molecules⁽¹¹⁾. Since both canonical (Smad mediated) and non-canonical (p38 MAPK mediated) BMP signalling pathways have been described to function in T cells^(21,22), an alternative explanation is that BMP2 and BMP4 could differentially trigger the Smad and non-Smad-dependent signalling pathways leading to distinct cell responses, as reported in other cellular systems^(26,27).

In summary, we show that the BMP pathway is functional in peripheral murine CD4⁺ T cells. Furthermore, the expression of BMP receptors mainly in activated T cells and the BMP modulation of T cell proliferation suggest that BMP signalling is a physiological component of CD4⁺ T cell responses.

DISCLOSURES

The authors declare no financial conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants BFU2006-00651 (Ministerio de Educación y Ciencia), RD06/0010/0003 (Instituto de Salud Carlos III), GR74/07-910552 (Universidad Complutense / Comunidad Autónoma de Madrid), and PR34/07-15867 (Universidad Complutense / Grupo Santander).

CORRESPONDENCIA:

Angeles Vicente, PhD

Departamento de Biología Celular. Facultad de Medicina.

Universidad Complutense. 28040 Madrid, Spain

Phone: +34 91 3947166. Fax: +34 91 3941396

E-mail: avicente@bio.ucm.es

REFERENCIAS

1. Kingsley DM. The TGF- β superfamily: New members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 1994;8:133-146.
2. Balemans W, Van Hul W. Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: A cocktail of modulators. *Dev Biol* 2002;250:231-250.
3. Gazzero E, Minetti C. Potential drug targets within bone morphogenetic protein signaling pathways. *Curr Opin Pharmacol* 2007;7:325-333.
4. Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998; 9:49-61.
5. Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: Transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:251-263.
6. Zwijsen A, Verschueren K, Huylebroeck D. New intracellular components of bone morphogenetic protein/Smad signaling cascades. *FEBS Lett* 2003;546:133-139.
7. Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K. Two major Smad pathways in TGF- β superfamily signalling. *Genes Cells* 2002;7:1191-1204.
8. Guo X, Wang XF. Signaling cross-talk between TGF- β /BMP and other pathways. *Cell Res* 2009; 19: 71-88.
9. Urist MR. Bone: Formation by autoinduction. *Science* 1965; 150: 893-899.
10. Chen D, Zhao M, Harris SE, Mi Z. Signal transduction and biological functions of bone morphogenetic proteins. *Front Biosci* 2004; 9: 349-358.
11. Bhatia M, Bonnet D, Wu D, Murdoch B, Wrana J, Gallacher L, et al. Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 1999; 189: 1139-1148.
12. Detmer K, Walker AN. Bone morphogenetic proteins act synergistically with haematopoietic cytokines in the differentiation of haematopoietic progenitors. *Cytokine* 2002; 17: 36-42.
13. Grassinger J, Simon M, Mueller G, Drewel D, Andreesen R, Hennemann B. Bone morphogenetic protein (BMP)-7 but not BMP-2 and BMP-4 improves maintenance of primitive peripheral blood-derived hematopoietic progenitor cells (HPC) cultured in serum-free medium supplemented with early acting cytokines. *Cytokine* 2007; 40: 165-171.
14. Kersten C, Dosen G, Myklebust JH, Sivertsen EA, Hystad ME, Smeland EB, et al. BMP-6 inhibits human bone marrow B lymphopoiesis-upregulation of Id1 and Id3. *Exp Hematol* 2006; 34:72-81.
15. Kersten C, Sivertsen EA, Hystad ME, Forfang L, Smeland EB, Myklebust JH. BMP-6 inhibits growth of mature human B cells; induction of Smad phosphorylation and upregulation of Id1. *BMC Immunol* 2005; 6: 9.
16. Hjertner O, Hjorth-Hansen H, Borset M, Seidel C, Waage A, Sundan A. Bone morphogenetic protein-4 inhibits proliferation and induces apoptosis of multiple myeloma cells. *Blood* 2001; 97: 516-522.
17. Ro TB, Holt RU, Brenne AT, Hjorth-Hansen H, Waage A, Hjertner O, et al. Bone morphogenetic protein-5, -6 and -7 inhibit growth and induce apoptosis in human myeloma cells. *Oncogene* 2004; 23:3024-3032.
18. Cejalvo T, Sacedon R, Hernandez-Lopez C, Diez B, Gutierrez-Frías C, Valencia J, et al. Bone morphogenetic protein-2/4 signalling pathway components are expressed in the human thymus and inhibit early T-cell development. *Immunology* 2007; 121: 94-104.
19. Graf D, Nethisinghe S, Palmer DB, Fisher AG, Merkenschlager M. The developmentally regulated expression of Twisted gastrulation reveals a role for bone morphogenetic proteins in the control of T cell development. *J Exp Med* 2002; 196: 163-171.
20. Hager-Theodorides AL, Outram SV, Shah DK, Sacedon R, Shrimpton RE, Vicente A, et al. Bone morphogenetic protein 2/4 signaling regulates early thymocyte differentiation. *J Immunol* 2002; 169: 5496-5504.

21. de la Pena LS, Billings PC, Fiori JL, Ahn J, Kaplan FS, Shore EM. Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP), a disorder of ectopic osteogenesis, misregulates cell surface expression and trafficking of BMPRIA. *J Bone Miner Res* 2005; 20: 1168-1176.
22. Sivertsen EA, Huse K, Hystad ME, Kersten C, Smeland EB, Myklebust JH. Inhibitory effects and target genes of bone morphogenetic protein 6 in Jurkat TAg cells. *Eur J Immunol* 2007; 37: 2937-2948.
23. Kretschmar M, Liu F, Hata A, Doody J, Massague J. The TGF- β family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev* 1997; 11: 984-95.
24. Yamaguchi A, Ishizuya T, Kintou N, Wada Y, Katagiri T, Wozney JM, et al. Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 220: 366-371.
25. Yokouchi Y, Sakiyama J, Kameda T, Iba H, Suzuki A, Ueno N, et al. BMP-2/-4 mediate programmed cell death in chicken limb buds. *Development* 1996; 122: 3725-3734.
26. Haynes T, Gutierrez C, Aycinena JC, Tsonis PA, Del Rio-Tsonis K. BMP signaling mediates stem/progenitor cell-induced retina regeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 20380-20385.
27. Kendall SE, Battelli C, Irwin S, Mitchell JG, Glackin CA, Verdi JM. NRAGE mediates p38 activation and neural progenitor apoptosis via the bone morphogenetic protein signaling cascade. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 7711-7724.

Expression of BMPRIA on human thymic NK cell precursors: role of BMP signaling in intrathymic NK cell development

Laura Hidalgo,¹ Víctor G. Martínez,¹ Jaris Valencia,¹ Carmen Hernández-López,¹ Miriam N. Vázquez,¹ José R. Nuñez,² Agustín G. Zapata,³ Rosa Sacedón,¹ *Alberto Varas,¹ and *Angeles Vicente¹

¹Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain; and ²Transplant Coordination Unit, Hospital Clínico San Carlos, Faculty of Medicine, Complutense University, Madrid, Spain; and ³Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University, Madrid, Spain

The bone morphogenetic protein (BMP) signaling pathway regulates survival, proliferation, and differentiation of several cell types in multiple tissues, including the thymus. Previous reports have shown that BMP signaling negatively regulates T-cell development. Here, we study the subpopulation of early human intrathymic progenitors expressing the type IA BMP receptor (BMPRIA) and provide evidence that CD34⁺CD1a[−]BMPRIA⁺ precursor cells mostly express surface cell markers and transcription factors typi-

cally associated with NK cell lineage. These CD34⁺ cells mostly differentiate into functional CD56⁺ natural killer (NK) cells when they are cocultured with thymic stromal cells in chimeric human-mouse fetal thymic organ cultures and also in the presence of SCF and IL-15. Moreover, autocrine BMP signaling can promote the differentiation of thymic NK cells by regulating the expression of key transcription factors required for NK cell lineage (eg, Id3 and Nfil3) as well as one of the components of IL-15 recep-

tor, CD122. Subsequently, the resulting population of IL-15-responsive NK cell precursors can be expanded by IL-15, whose action is mediated by BMP signaling during the last steps of thymic NK cell differentiation. Our results strongly suggest that BMPRIA expression identifies human thymic NK cell precursors and that BMP signaling is relevant for NK cell differentiation in the human thymus. (*Blood*. 2012;119(8):1861-1871)

Introduction

Natural killer (NK) cells are CD3[−]CD56⁺ large granular lymphocytes that function within the innate immune system to provide protection against infection and cancer, and they also can produce cytokines and chemokines to influence the adaptive immune response.¹ NK cells develop from CD34⁺ hematopoietic precursor cells, and it is generally accepted that bone marrow is the main site of NK cell development in adult humans.^{1,2} However, several reports have shown that hematopoietic precursors and developing NK cells also can be found in human adult intestine,³ uterus,^{4,5} liver,⁶ and secondary lymphoid tissues, such as lymph nodes and tonsils.⁷ The thymus also is considered a site of NK cell development because mature NK cells and multipotent as well as bipotent T/NK and NK/dendritic cell (DC) precursors can be isolated from human postnatal thymus, but a complete pathway of NK cell differentiation at this site has not been defined in humans.^{8–11} By contrast, it has been recently demonstrated in mice the existence of a thymic pathway of NK cell development characterized by expression of CD127 and GATA-3.¹² Thymic NK cell development also has been reported to rely on the expression of members of the inhibitor of differentiation/DNA binding (Id) protein family, such as Id2 and Id3, the down-regulation of Notch signaling and the balance between Nfil3/E4bp4 and Bcl11b transcription factors.^{13–16}

The bone morphogenetic protein (BMP) family includes secreted signaling proteins that bind to a heteromeric receptor complex commonly constituted by the following type I and type II serine-threonine kinase receptors: type IA BMP receptor (BMPRIA)/

ALK-3, type IB BMP receptor (BMPRII)/ALK-6, type I Activin receptor (ActRIA)/ALK-2, and type II BMP receptor (BMPRII).^{17–19} On BMP binding, type II receptors phosphorylate type I receptors that then activate the BMP receptor-regulated Smads (BR-Smads) by phosphorylation. Subsequently, BR-Smads bind to the common partner Smad4, and the complex translocates into the nucleus where it regulates the transcription of BMP target genes, including Id proteins and Runx transcription factors.^{18,20,21}

It is now known that BMPs are involved in the development of virtually all organs and the maintenance and renewal of several adult tissues, such as the hematopoietic and lymphoid tissues.^{22–26} In the thymus, both cortical and medullary epithelial cells express BMP receptors and produce BMP2 and BMP4 ligands.^{27–29} Thymocyte precursors also produce BMP4 and express the type I and type II BMP receptors as well as the BR-Smads required to initiate the intracellular signaling.^{27,28,30} The stimulation of BMP signaling pathway by treatment with BMP4 of fetal thymic organ cultures (FTOCs) enhances cell survival; inhibits thymocyte expansion; and, importantly, prevents differentiation along the T-cell lineage.^{27–31} On the contrary, the neutralization of the action of endogenously produced BMPs by treatment with different BMP inhibitors enhances thymocyte proliferation and promotes the differentiation of CD4⁺CD8⁺ thymocytes, suggesting that BMP signaling acts as a negative regulator of T-cell development.^{26,28,31}

Here, we show that the subpopulation of early human intrathymic CD34⁺CD1a[−] progenitor cells expressing BMPRIA contains a

Submitted July 29, 2011; accepted December 16, 2011. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, December 30, 2011; DOI 10.1182/blood-2011-07-370650.

The online version of the article contains a data supplement.

*A. Varas and A. Vicente contributed equally to this work.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2012 by The American Society of Hematology

large proportion of NK cell lineage-committed precursor cells. In addition, we provide evidence that autocrine BMP signaling is relevant for the differentiation of human thymic NK cells.

Methods

Cell isolation from human tissues

Human thymus samples from patients aged 1 month to 5 years undergoing corrective cardiac surgery were obtained and used according to the guidelines of the Medical Ethics Commission of Madrid-Montepíncipe and 12 de Octubre hospitals. Informed consent was provided according to the Declaration of Helsinki. Thymuses were dissected free of surrounding connective tissue and then gently disrupted with a potter homogenizer until completely disaggregated. To isolate thymic CD34⁺ precursors, thymocyte suspensions were enriched in immature thymocytes by using the sheep red blood cell rosetting technique followed by mAb-coupled magnetic bead treatment (Dynabeads; Invitrogen) to deplete T cells, B cells, NK cells, myeloid cells, and DCs, as described previously.³² These CD34-enriched cell suspensions were next stained with anti-CD34, anti-CD1a, and anti-BMPRIA Abs, and CD34⁺CD1a[−], CD34⁺CD1a[−]BMPRIA[−], and CD34⁺CD1a[−]BMPRIA⁺ cell subpopulations were sorted on an FACS Vantage SE (BD Biosciences) from the Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia (Universidad Complutense de Madrid).

Lymph nodes were obtained from brain dead tissue donors through the Transplant Coordination Unit, Hospital Clínico San Carlos. Tissue cells were dispersed with a potter homogenizer followed by Ficoll centrifugation. Mononuclear cells were then used for flow cytometry analysis.

Flow cytometry and Abs

The following mAbs conjugated with FITC, PE, Pe-Cy5, PerCP, APC, or Alexa Fluor 647 were used for flow cytometric analysis: CD1a (HI149), CD3 (33-2A3 and UTH-C1), CD4 (RPA-T4), CD5 (UCHT2), CD7 (CD7-6B7), CD8 (RPA-T8), CD33 (WM53), CD34 (8G12 and 581), CD38 (HIT2), CD44 (G44-26), CD45 (2DI), CD45RA (HI100), CD56 (B159 and HCD56), CD94 (DX22), CD116 (MSB12), CD117 (YB5.B8), CD122 (MIK-β1), CD127 (R34.34), CD135 (BV10A4H2), CD161 (DX12), CD215 (JM7A4), CD335/NKp46 (9E2), IL-22 (142928), and RORC (AFKJS-9), from BD Biosciences, BioLegend, Beckman Coulter, Invitrogen, R&D Systems, Immunotools, and eBioscience. The extracellular domain of BMPRIA and BMP4 were detected with antibodies from R&D Systems and Santa Cruz Biotechnology, respectively. Immunofluorescence stainings for cell surface antigens, intracellular stainings, and annexin V stainings were performed as described previously.³⁰ Analyses were conducted in an FACSCalibur flow cytometer (Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia, Universidad Complutense de Madrid).

Quantitative RT-PCR

Real-time PCR was performed with specific TaqMan assays (Applied Biosystems) as described previously.³² GNB2L1 was used as endogenous control. Amplifications, detections, and analyses were performed in a 7.900HT Fast Real-time PCR System (Centro de Genómica, Universidad Complutense de Madrid). The Delta CT method was used for normalization to GNB2L1 mRNA.

Chimeric human-mouse FTOCs

Thymic lobes derived from 15-day-old embryos of SCID mice were recolonized with human CD34⁺CD1a[−]BMPRIA⁺ or CD34⁺CD1a[−]BMPRIA[−] thymic progenitors ($1-2 \times 10^4$ cells/lobe) as described previously.²⁷

NK cell differentiation assays

Thymic CD34⁺ progenitor subpopulations were cultured, as described previously,³² for different times in the presence of recombinant human (rh)SCF (100 ng/mL; ProSpec) and rhIL-15 (1-100 ng/mL; ProSpec). In

some experiments rhBMP-4 (50 ng/mL; HumanZyme) or dorsomorphin (5 μM; Merck) also were added to the culture medium.

Proliferation and cytotoxicity assays

To analyze cell proliferation, cultures were pulsed for 12 hours with 10 μM BrdU. A BrdU Labeling and Detection Kit III (Roche Diagnostics) was used to measure BrdU incorporation into newly synthesized DNA, as described previously.³⁰

Cytotoxicity was measured using the nonradioactive Cytotoxicity Detection Kit LDH (Roche Diagnostics), following the manufacturer's instructions. In brief, effector cells were cultured overnight in the presence of IL-12 (10 ng/mL) and IL-15 (100 ng/mL) and then cocultured with K562 cells in 96-well plates for 4 hours at different effector-to-target ratios. The percentage of specific lysis was determined from the amount of lactate dehydrogenase activity detected in culture supernatants.

BMP4 and cytokine measurements

Cells derived from FTOCs and NK cell differentiation assays were stimulated overnight with IL-12 plus IL-15, and the concentrations of IFN-γ, IL-10, and TNF-α were determined in the supernatants by ELISA (BioLegend). BMP4 levels were measured using an ELISA kit (R&D Systems).

Electron microscopy

Organ-cultured thymic lobes were fixed by immersion in 4% glutaraldehyde, buffered to pH 7.3 with Millonig's fluid, postfixed in 1% osmium tetroxide in the same buffer, and dehydrated in acetone for embedding in Araldite (Sigma-Aldrich). Sections were obtained with an OM-U3 ultramicrotome (Reichert). Ultrathin sections were double-stained with uranyl acetate and lead citrate and then examined in a JEM 1010 electron microscope (JEOL) at Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia, Universidad Complutense de Madrid. Images were generated using a MegaView G2 camera (Zeiss) and the iTEM Imaging Platform software (Olympus).

Statistical analysis

The Student *t* test was used for statistical analysis. Values of *P* ≤ .05 (*), *P* ≤ .01 (**), and *P* ≤ .001 (***) were considered to be statistically significant.

Results

Phenotypic characterization and gene expression profile of human CD34⁺CD1a[−]BMPRIA⁺ intrathymic precursors

We reported previously the presence of a functional BMP2/4 signaling pathway in human thymic CD34⁺ cells. Intrathymic precursor cells expressed the factors needed for BMP signal transduction, BR-Smads, and Co-Smad proteins, as well as the type I BMP receptors, BMPRI, ActRIA, and mainly BMPRIA.³⁰

To better define the thymic progenitor cell subpopulation responding to BMP signals, we first conducted a flow cytometry analysis of CD34⁺CD1a[−]BMPRIA⁺ and CD34⁺CD1a[−]BMPRIA[−] cells, representing ~20% and 80%, respectively, of the early intrathymic CD34⁺CD1a[−] precursor cell population. The phenotypic analysis showed that BMPRIA⁺ precursors mostly expressed the NK cell lineage-related marker CD161, as well as CD215/IL-15 receptor α and CD122/IL-2 receptor β. In contrast, the expression of these cell markers was markedly lower or even absent in BMPRIA[−] precursor cells (Figure 1A). Likewise, a much higher proportion of BMPRIA⁺ thymic progenitors expressed the cytokine receptors CD116/GM-CSF receptor α and CD135/Flt3. The expression of CD127/IL-7 receptor α and CD117/c-kit was

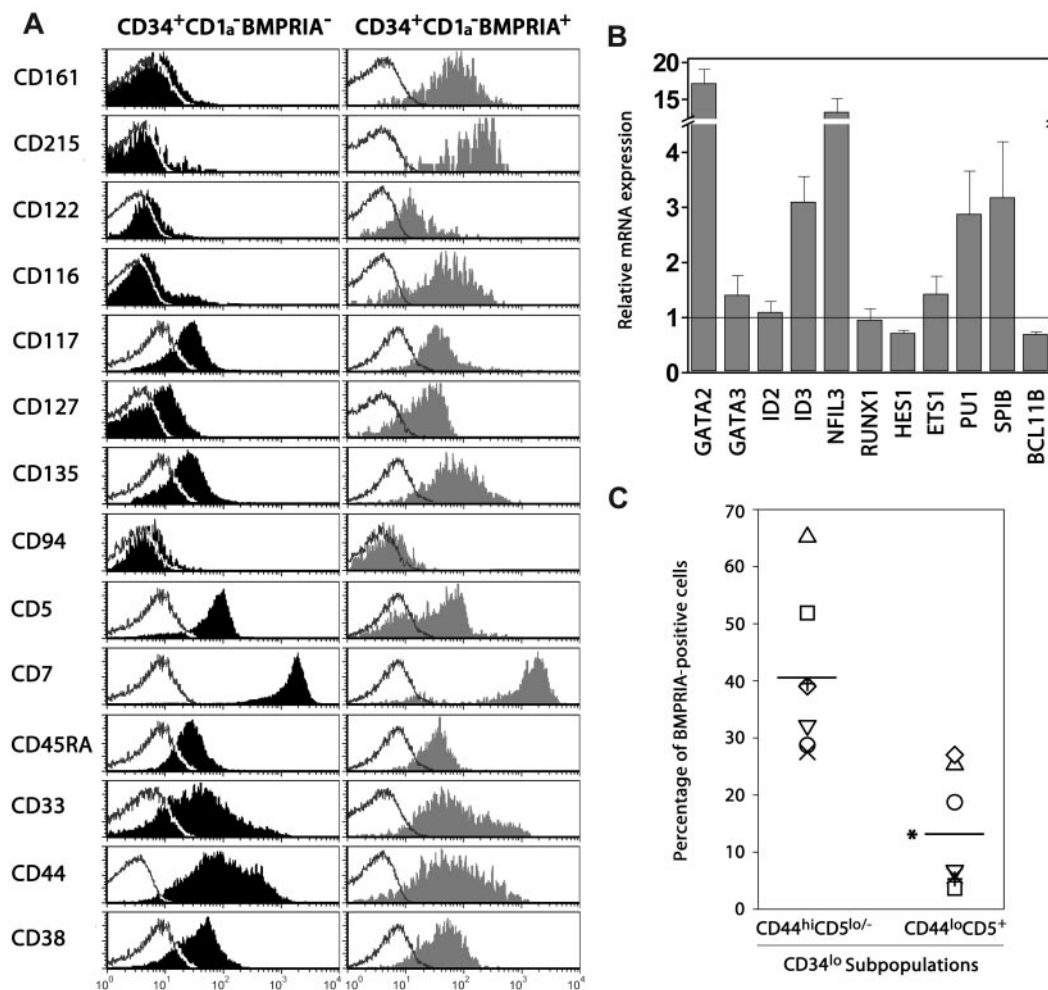


Figure 1. Surface marker expression pattern and gene expression profile of human CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ intrathymic precursors. (A) Purified thymic CD34⁺CD1a⁻ cells were stained with anti-BMPRIA Abs and a range of mAbs against differentiation-specific antigens, and then they were analyzed by flow cytometry. Solid histograms represent the expression of the indicated cell surface markers on CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁻ and CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ cell subsets. Open histograms represent background fluorescence using isotype-matched irrelevant mAbs. Similar staining patterns were obtained in 5 different experiments. (B) Gene expression in sorted CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ thymic precursors. Transcription levels of different genes were normalized for GNB2L1 mRNA content and are shown relative to GNB2L1-normalized transcription in the CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁻ cell subset. (C) Percentage of BMPRIA⁺ cells in CD34^{lo}CD44^{hi}CD5^{lo/-} and CD34^{lo}CD44^{lo}CD5⁺ thymic precursor subpopulations. Horizontal bar represents the mean of 7 independent experiments (**P* ≤ .05 by *t* test).

also significantly higher in the CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ precursor cell subset (Figure 1A). Approximately 50% to 60% of BMPRIA⁺ progenitors were positive for CD5 antigen, and no expression of CD94 was found in BMPRIA⁺ and BMPRIA⁻ precursor cell subpopulations (Figure 1A).

Remarkably, the expression of the transcription factor Nfil3/E4bp4, recently described to be essential for NK cell development,^{33,34} was 10 times higher in thymic BMPRIA⁺ precursors, as shown by the quantitative PCR results (Figure 1B). The expression of Id3, which also regulates the development of NK cells,¹³ was 3 to 4 times higher in the subpopulation of BMPRIA⁺ precursors, and GATA-2, PU.1, and SpiB mRNAs were also more abundant in BMPRIA⁺ progenitor cells (Figure 1B). Similar levels of GATA-3, Id2, Runx1, and Ets1 transcription factors were found in both CD34⁺ cell subsets (Figure 1B). On the contrary, Bcl11b, a key factor required for T-cell lineage,^{35,36} and Hes1 expression was lower in CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ than in CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁻ cells (Figure 1B).

Because all these data suggested that the CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ subpopulation contained precursor cells committed toward the NK

cell lineage, we analyzed the expression of BMPRIA in 2 distinct intrathymic precursor cell subpopulations that exhibit different lymphoid and myeloid precursor potential. Human CD34^{lo}CD44^{hi}CD5⁺ thymocytes are able to generate T cells but have lost the potential to generate DCs, whereas CD34^{lo}CD44^{hi}CD5^{lo/-} cells are progenitors with increased ability to generate myeloid cells but devoid of T-cell precursor activity. Although both subpopulations display NK cell precursor potential, CD34^{lo}CD44^{hi} precursors are consistently more efficient than CD34^{lo}CD44^{lo} thymocytes in generating NK cells.¹¹ In correlation with these findings, we detected BMPRIA expression in a much higher proportion of CD34^{lo}CD44^{hi} precursors (41%; range, 30%-66%), in comparison with CD34^{lo}CD44^{lo} thymocytes (12%; range, 3%-25%; Figure 1C).

CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ intrathymic precursors mainly generate functional NK cells

CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ and CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁻ precursor cell subpopulations were next used to reconstitute alymphoid thymic lobes from fetal SCID mice. The differentiation potential of

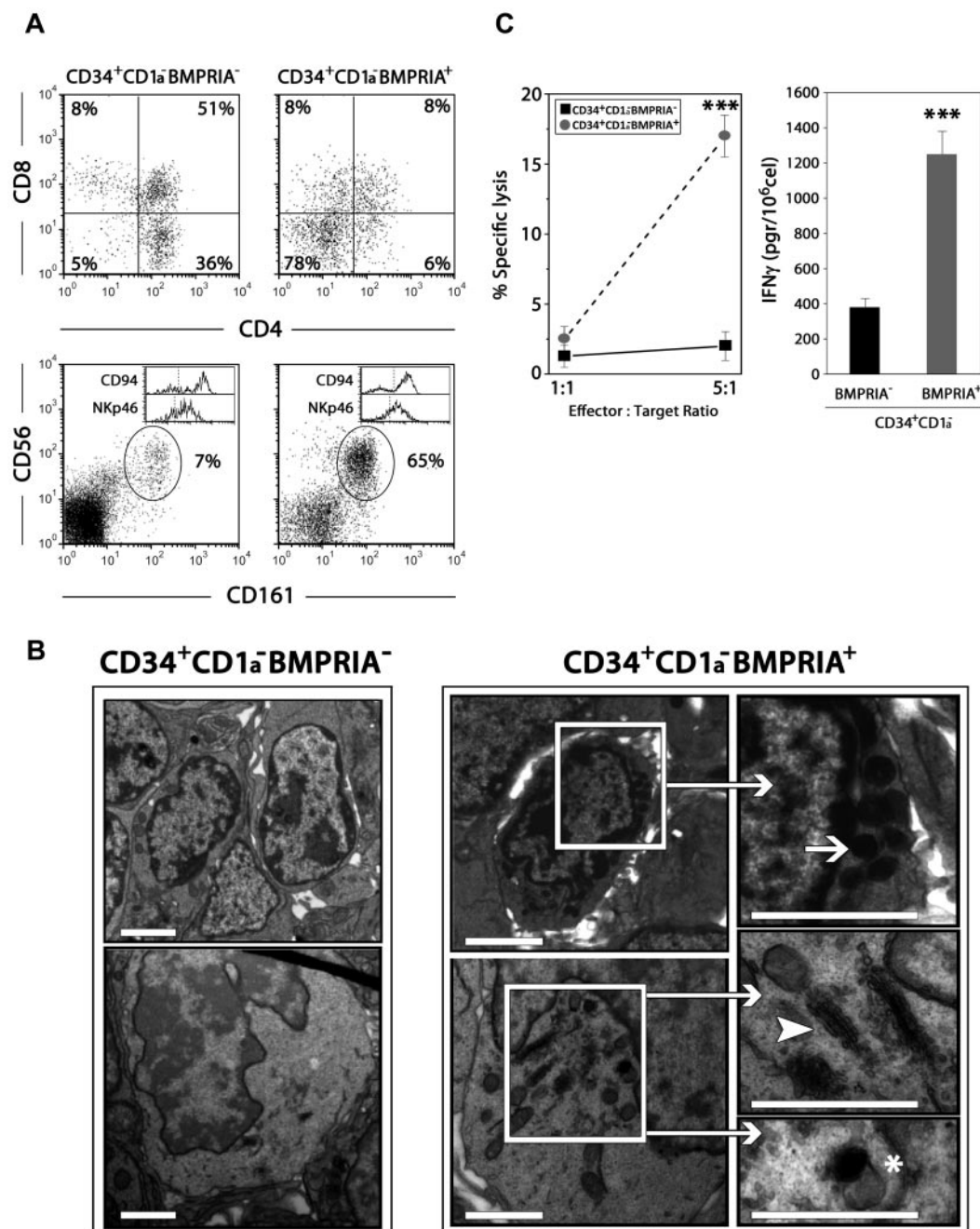


Figure 2. Human CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ thymic precursors generate functional NK cells. Chimeric human-mouse FTOCs were performed with sorted human thymic CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁻ or CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ cells and cultured for 9 days. (A) Cells recovered from hybrid FTOCs were labeled with anti-human CD45, anti-CD3, anti-CD4, and anti-CD8 or anti-human CD45, anti-CD3, and anti-CD56 combined with anti-CD161, anti-CD94, or anti-NKp46 mAbs. Dot plots show the expression of CD4/CD8 and CD56/CD161 on gated human CD45⁺ cells from hybrid FTOCs. Histograms show the expression of CD94 and NKp46 in human CD3⁻CD56⁺ cells. Data are representative of 4 independent experiments wherein a pool of at least 3 thymic lobes per experiment was analyzed. In the experiment shown, human cell recoveries were 4×10^4 and 1.4×10^4 for FTOCs reconstituted with CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁻ or CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ cells, respectively. (B) Large numbers of NK cells develop in hybrid FTOCs reconstituted with CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ cell precursors. NK cells appear as round elements showing numerous electron-dense granules in the cytoplasm arranged close to the nucleus (arrow). Immature NK cells exhibit a well-developed Golgi complex (arrowhead) and moderately electron-dense secretory vesicles (asterisk). In contrast, thymocytes predominate in hybrid FTOCs reconstituted with CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁻ cell precursors. Scale bars represent 2 μ m. (C) Equal numbers of total human cells were used to assay the cytolytic capacity and IFN- γ production by NK cells generated in hybrid FTOCs reconstituted with CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁺ or CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁻ precursors. The data represent the mean \pm SD from 3 to 5 independent experiments (*** $P \leq .001$ by *t* test).

these two cell subpopulations was different; thus, when thymic lobes were reconstituted with BMPRIA⁻ precursors, the percentage of CD3⁻CD161⁺CD56⁺ cells did not exceed 10%, and most cells exhibited a typical T-cell phenotype. On the contrary, when thymus lobes were reconstituted with BMPRIA⁺ precursors, the percentage of CD3⁻CD161⁺CD56⁺ NK cells may reach more than 60%, whereas the proportion of CD4⁺CD8⁺ thymocytes generated

was minimal (Figure 2A). In both cultures, NK cells mostly expressed CD94 and NKp46 (Figure 2A).

The ultrastructural study of the chimeric human-mouse FTOCs demonstrated that in the thymus lobes reconstituted with BMPRIA⁺ precursors largely predominated cells containing abundant dense spherical granules, morphologically identifiable as NK cells (Figure 2B). Moreover, cells showing a dilated Golgi apparatus and

immature secretory vesicles, presumably immature differentiating NK cells, also were observed in these thymus lobes (Figure 2B). In contrast, thymocytes were mainly present throughout the thymic parenchyma in FTOCs recolonized with BMPRIA[−] progenitors (Figure 2B).

To support the fact that CD34⁺CD1a[−]BMPRIA⁺ progenitors are able to generate higher numbers of NK cells, we assessed the cytotoxicity and cytokine production capacity of cells generated in both types of FTOC. As shown in Figure 2C, whereas cells recovered from the lobes reconstituted with BMPRIA[−] precursors were only able to respond minimally in a conventional cytotoxicity assay against a standard target cell line (K562), the cells generated in lobes reconstituted with BMPRIA⁺ precursors, which mostly corresponded to NK cells, were found to exhibit a significant cytotoxic capability. Concomitantly, the production of IFN- γ was notably higher in FTOC recolonized with CD34⁺CD1a[−]BMPRIA⁺ progenitors (Figure 2C).

These results show that the CD34⁺CD1a[−]BMPRIA⁺ cell subset gives rise mostly to functional NK cells in a thymic microenvironment and provide further support for the idea that a large number of the human thymic CD34⁺CD1a[−]BMPRIA⁺ progenitors represent NK cell precursors.

Thymic progenitors generate NK cells through a BMPRIA⁺ intermediate stage

We investigated the differentiation of intrathymic CD34⁺CD1a[−]BMPRIA[−] progenitors in a differentiation assay specific to NK cell production. At various days after culture in the presence of SCF and IL-15, cells were harvested and flow cytometry and quantitative PCR analyses were performed. Approximately 15% to 20% of the recovered cells expressed the NK cell-associated marker CD161 after 48 hours of culture (Figure 3A). In addition, CD161⁺ cells mostly expressed BMPRIA, suggesting that the up-regulation of BMP signaling is an early event in human thymic NK cell development (Figure 3A). The frequency of CD161⁺BMPRIA⁺ cells increased in the next days of culture, but as cells acquired other NK cell markers, such as CD56, CD94, and Nkp46, the expression of BMPRIA was down-regulated. Thus, the most mature population of CD94⁺CD161⁺CD56⁺ NK cells expressed low levels of BMPRIA (Figure 3A). In agreement, BMPRIA expression was detected in a higher proportion of freshly isolated immature thymic NK cells in comparison with mature NK cells (supplemental Figure 1, available on the *Blood* Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article).

We also examined during the culture period the relative mRNA expression of genes relevant for NK cell development. As expected, under the influence of SCF and IL-15, the levels of transcription factors such as Nfil3, Id2, Id3, Runx3, Gata3, and T-bet as well as CD122 and Galectin-1 drastically increased throughout the culture (Figure 3B). Remarkably, the levels of transcripts for BMPRIA were increasing in parallel to those for transcription factors pivotal for NK cell development (Figure 3B). On the contrary, the expression of the Notch target gene Hes-1 was gradually decreasing during the whole culture period (Figure 3B); and Bcl11b, whose expression is also controlled by Notch signaling,³⁵ and Runx1 were down-regulated from the first days of culture (Figure 3B).

BMP signaling is involved in NK cell development

We further evaluated whether BMP4 is autocrinally produced by developing NK cells. As shown in Figure 4A, BMP4 production

started in the first days of culture and was initially associated with thymic precursors in progress toward NK cell commitment (Figure 3A). In the following days, BMP4 levels progressively augmented along with the appearance of increasing proportions of NK cells, and both CD161⁺CD56[−] and CD161⁺CD56⁺ NK cells produced BMP4 (Figures 3A and 4A). Therefore, thymus-derived NK cells up-regulate both BMPRIA expression and BMP4 secretion capacity from the early steps of the differentiation process.

To explore the involvement of BMP signaling during NK cell differentiation, thymic precursors were cultured in the presence of SCF and IL-15 plus dorsomorphin, an inhibitor of BMP type I receptor serine-threonine kinase activity that blocks BMP ligand-induced phosphorylation of BR-Smads.³⁷ The addition of dorsomorphin resulted in a profound decrease (60%-80% reduction) in the numbers of NK cells generated from thymic progenitors (Figure 4B), and the CD161⁺CD56[−] immature NK cell subpopulation was the most affected by the treatment with dorsomorphin (Figure 4C). The fact that BMP4 addition to the cultures counteracted the effects of dorsomorphin on NK development indicated that dorsomorphin was not nonspecifically toxic to developing NK cells but was inhibiting a biologic effect (Figure 4C).

BMP signaling regulates apoptosis and cell cycle progression in many developmental systems.^{19,38} Then, we analyzed the effects of dorsomorphin addition on the proliferation rate and apoptosis in the first days of culture, when most cells were NK precursors and immature NK cells. The blockade of BMP signaling pathway by dorsomorphin treatment reduced the IL-15-dependent expansion (Figure 4D) and also increased the percentage of apoptotic cells in cultures supplemented with dorsomorphin (range, 40%-55%) in comparison with control cultures (range, 4%-9%; Figure 4E). These results suggest that the autocrine production of BMP4 is necessary for the expansion and survival during thymic NK cell differentiation.

As shown in Figure 4B and C, some mature CD161⁺CD56⁺ NK cells could appear in the presence of dorsomorphin. However, the analysis of those cells showed that they exhibited an impaired cytotoxic capacity (Figure 4F) and a reduced ability to produce cytokines such as IFN- γ , IL-10, and TNF- α (Figure 4G), suggesting that BMP signaling also is required during NK cell differentiation for the acquisition of the functional capabilities of mature NK cells.

BMP4 and IL-15 cooperate in thymic NK cell differentiation

The above-mentioned results suggest that there is an interplay between IL-15 and BMP signaling during NK cell differentiation. To dissect this interaction, we first studied whether the IL-15-induced NK cell differentiation involves the up-regulation of BMP signaling. Using NK cell differentiation assays, the addition of increasing doses of IL-15 to the cultures, ranging from 1 to 100 ng/mL, showed that the expression of BMPRIA was highly induced in differentiating NK cells (Figure 5A), and the secretion of BMP4 also was increased in the culture medium, mainly when the highest dose of IL-15 was added (Figure 5B). Then, these results indicate that IL-15 promotes BMP signaling, in accordance with the fact that the inhibition of the BMP signaling pathway, using dorsomorphin, drastically inhibited the IL-15-induced expansion of thymic NK cell precursors.

Next, we determined whether BMP4 could support NK cell development in the absence of IL-15 signaling. After 6 days, no cells were recovered from cultures supplemented only with SCF (Figure 5C). In contrast, the presence of BMP4 allowed the differentiation of low numbers of immature CD161⁺CD56[−] NK cells, in comparison with the cultures supplemented with SCF

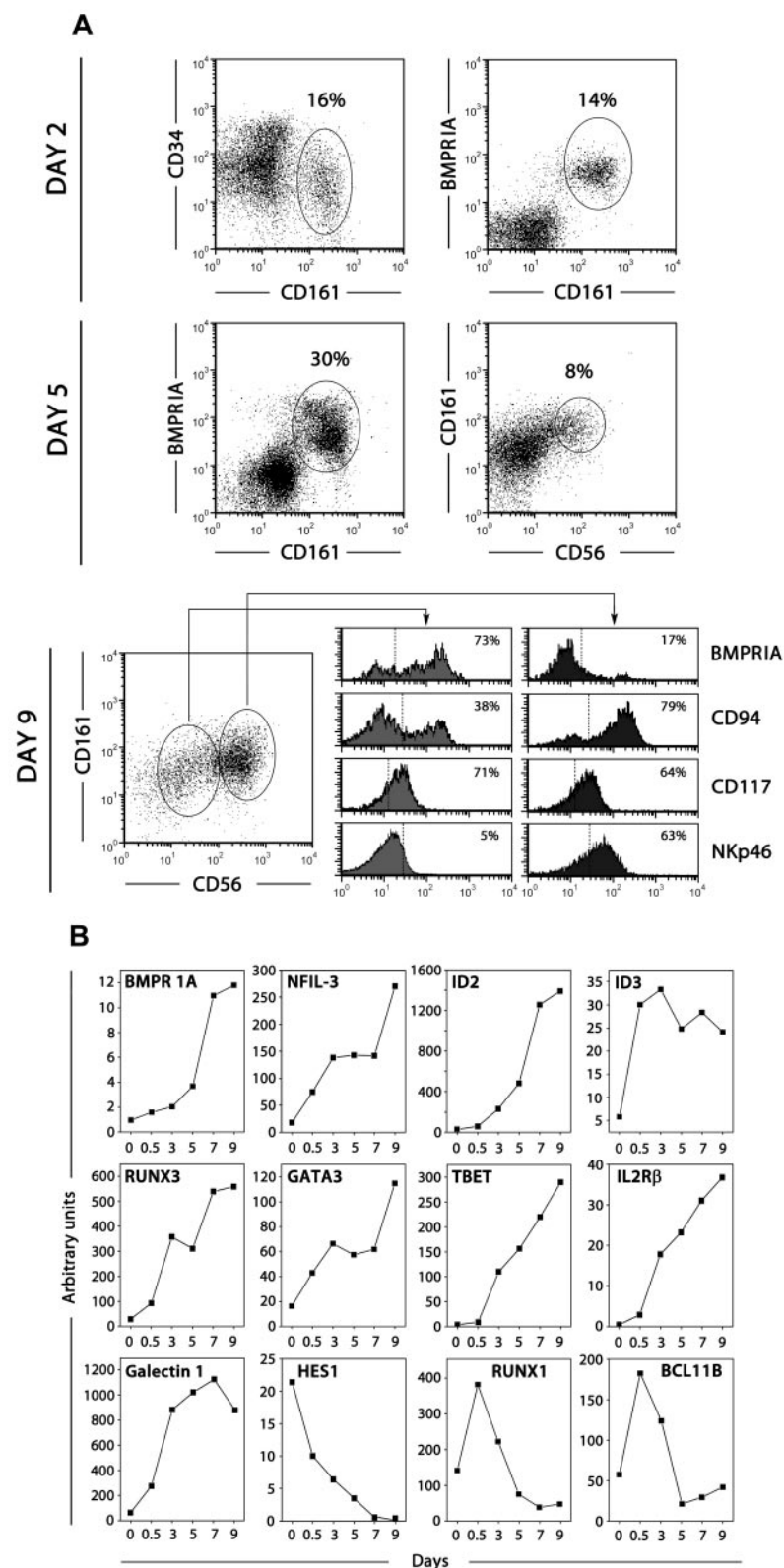


Figure 3. BMPRIA expression during NK cell development. (A) Thymic CD34⁺CD1a⁺BMPRIA⁺ precursor cells were cultured with SCF and IL-15 for different days and then analyzed by flow cytometry for the expression of CD34, CD161, BMPRIA, CD56, CD94, CD117, and NKp46. Representative phenotypic analyses of total cells harvested at different days of culture are shown. Percentages of positive cells are indicated in dot plots and histograms. (B) Quantitative RT-PCR analysis of the expression of BMPRIA and genes relevant for NK cell development was performed on cells derived from thymic precursors cultured with SCF and IL-15 for different days. Gene expression levels were normalized to GNB2L-1 mRNA content. The data are representative of at least 3 separate experiments.

and IL-15 where high numbers of mature CD161⁺CD56⁺ NK cells predominated (Figure 5C).

These data suggested that BMP signaling does not act only downstream but also upstream of IL-15. To address this issue, we analyzed the NK cell differentiation cultures at early time points, and we found that BMP4 was able to up-regulate the expression of

CD122, thereby rendering higher numbers of IL-15-responsive cells (Figure 5D). The early effects of BMP signaling on NK cell development also were revealed when the expression of genes related to NK cell differentiation was analyzed after BMP4 addition. As can be seen in Figure 5E, Id2, Runx3 and mainly Id3 appeared up-regulated after a short-time exposure to BMP4. The

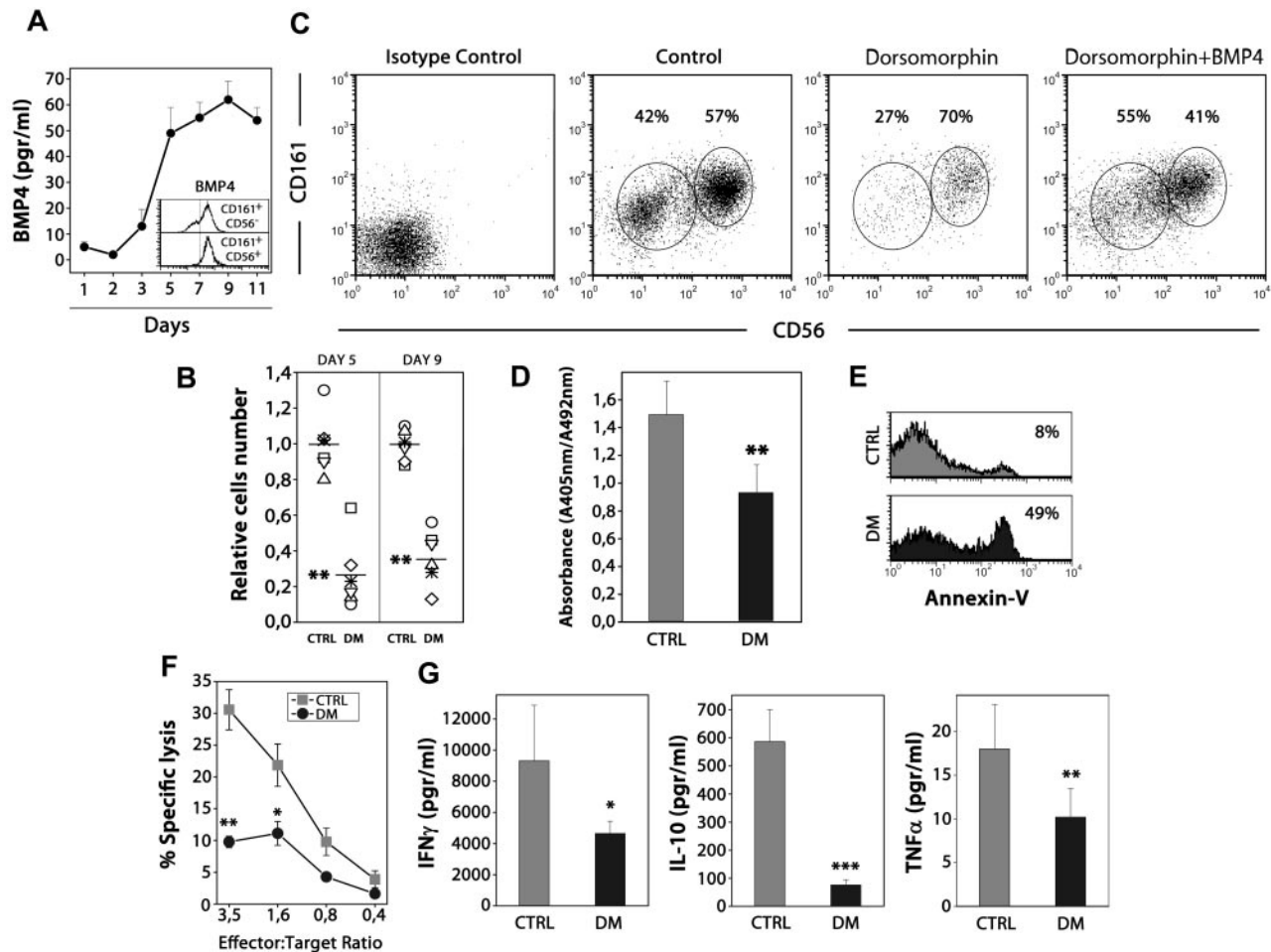


Figure 4. BMP signaling influences human NK differentiation. (A) The levels of BMP4 were determined by ELISA in the supernatants obtained culturing human thymic CD34⁺CD1a⁺BMPRIA⁺ precursors with SCF and IL-15 for different days. Data represent the mean \pm SD from 3 to 4 independent experiments. Histograms show intracellular staining for BMP4 on immature CD161⁺CD56⁺ and mature CD161⁺CD56⁺ NK cells generated after 7 days of culture. (B) The scatter plots show the effects on cell recovery when the BMP inhibitor dorsomorphin was added to the cultures. The number of cells recovered in each experiment was divided by the mean number of cells recovered from the control cultures, to give the relative cell number from 6 individual experiments (** $P \leq .01$ by t test). (C) Dot plots show CD161 versus CD56 expression from control and dorsomorphin-treated cultures after 9 days. As shown, the addition of BMP4 neutralized the inhibitory effect of dorsomorphin on human NK cell differentiation. (D) Determination of the proliferation rate of differentiating NK cells after 5 days of culture. Cells were pulsed for 12 hours with BrdU. A specific kit was used to measure BrdU incorporation into newly synthesized DNA. Results are the mean \pm SD of 4 independent experiments, each with 2 cultures per point (** $P \leq .01$ by t test). (E) Annexin V staining was measured by flow cytometry in NK cells harvested from control and dorsomorphin-treated cultures on day 5. Data are representative results from 3 independent experiments. (F) Equal numbers of NK cells generated in dorsomorphin-treated cultures (black circles) and untreated cultures (gray squares) were stimulated with IL-15 + IL-12 for 12 hours and assayed in a 4-hour standard cytotoxicity assay against K562 target cells at different effector-to-target ratios (E:T) in duplicate wells. The mean percentage of specific lysis \pm SD is represented ($n = 6$ different individuals) for each E:T ratio (* $P \leq .05$, ** $P \leq .01$ by t test). (G) NK cells (3×10^5 cells) recovered from control (gray bars) and dorsomorphin treated-cultures (black bars) were stimulated for 12 hours. Supernatants were collected and analyzed for the presence of IFN- γ , IL-10, and TNF- α (* $P \leq .05$, ** $P \leq .01$, and *** $P \leq .001$ by t test).

expression of Hes1 was decreased and no significant changes were found in the levels of Nfil3, CD122, and Bcl11b (Figure 5E). Furthermore, when autocrine BMP signaling was inhibited with dorsomorphin and the expression of NK cell-related genes was analyzed, we observed that the expression of Nfil3 was notably reduced by 60% to 70%, compared with the expression levels reached in control cultures. Similarly, the expression of Id3, Id2, Runx3, and to a lesser extent CD122 also was diminished when BMP signaling was blocked, whereas the expression of Hes1 and Bcl11b remained unaffected (Figure 5E). Collectively, these data show that BMP signaling is involved in several stages of thymic NK cell development.

BMPRIA also is expressed by CD34⁺ progenitors in human lymph nodes

Freud et al used the combination of CD34, CD117, and CD94 antigens to define distinct NK cell developmental intermediates in

human secondary lymphoid organs: stage 1, CD34⁺ CD117⁺ CD94⁺ pro-NK cells; stage 2, CD34⁺ CD117⁺ CD94⁺ pre-NK cells; stage 3, CD34⁺ CD117⁺ CD94⁺ committed immature NK cells; and stage 4, CD34⁺ CD117⁺ CD94⁺ CD56⁺ NK cells.⁷

We investigated whether BMPRIA expression also is associated with NK cell precursors in human lymph nodes. Figure 6A shows that a high proportion (60%-70%) of stage 2 pre-NK cells expressed BMPRIA in comparison with stage 1 pro-NK cells (15%-30%). In addition, approximately half of the subpopulation of immature NK cells maintained BMPRIA expression, which almost disappeared among mature NK cells (Figure 6B).

Discussion

Our previous studies had shown that BMP ligands are produced in the human thymus and that human CD34⁺ precursors are one of the

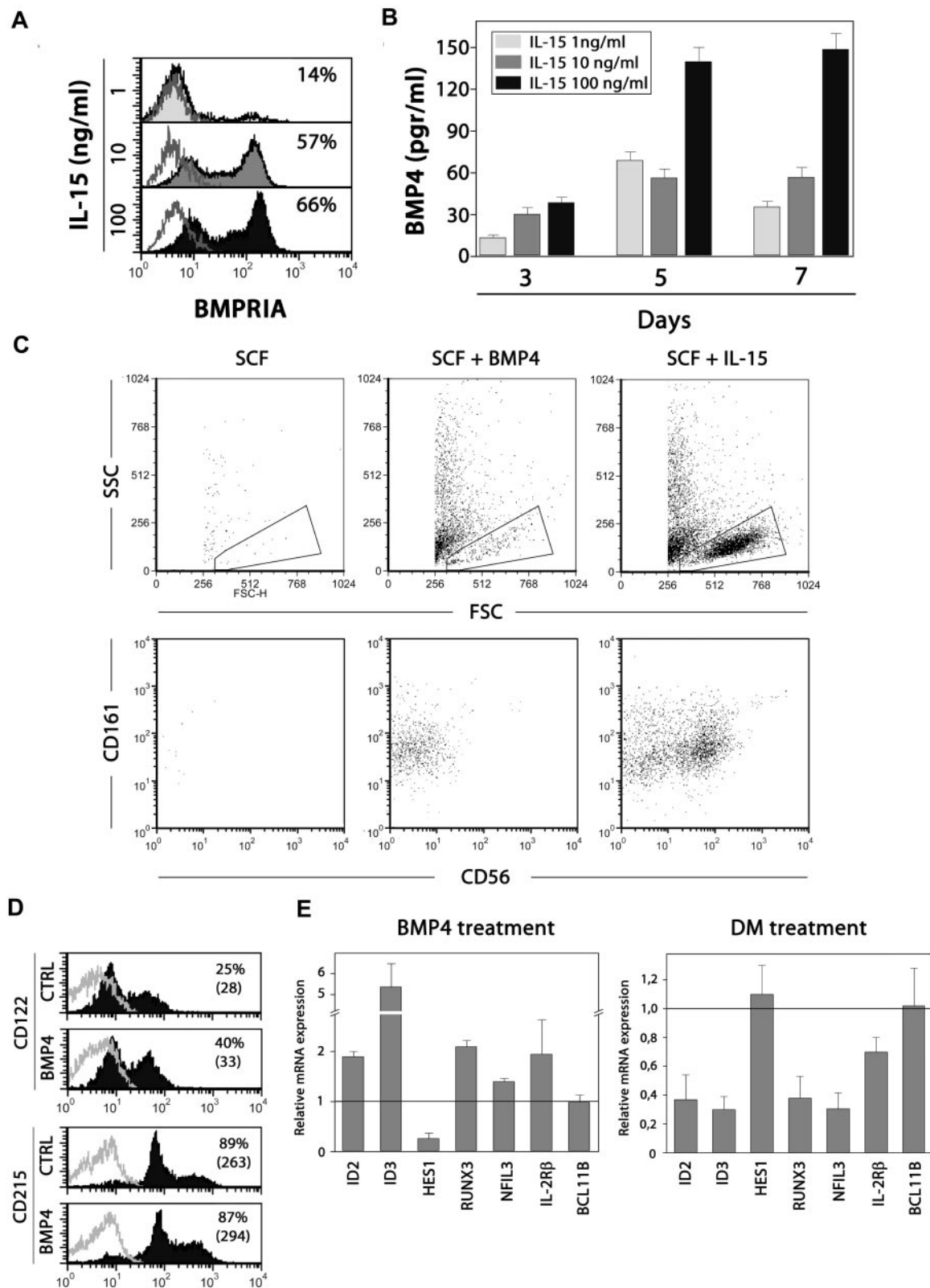


Figure 5. Interplay between BMP4 and IL-15 in NK cell differentiation. (A) BMPRIA expression on NK cells generated after culturing CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁻ cells for 7 days in the presence of SCF and different doses of IL-15. (B) The levels of BMP4 were determined in the supernatants of those cultures after 3, 5, and 7 days. Results are the mean \pm SD of 2 independent experiments. (C) Dot plots show forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) properties and CD161 and CD56 expression on cells derived from cultures supplemented with SCF alone (100 ng/mL), SCF + BMP4, or SCF + IL-15 (100 ng/mL) for 6 days. (D) Expression of CD122 and CD215 on thymic precursors after treatment with SCF and BMP4 for 36 hours. Control cells were cultured with SCF + IL-15. The percentages of positive cells (and their mean fluorescence intensities) are indicated in the histograms. One representative experiment of 3 is shown. (E) Expression of NK cell differentiation related genes after BMP4 or dorsomorphin treatment. Thymic CD34⁺CD1a⁻BMPRIA⁻ precursors were cultured for 36 hours with SCF + IL-15 and then pulsed for 1 hour with BMP4. To inhibit endogenous BMP signaling, dorsomorphin was present during the whole culture period. Transcription levels of different genes in BMP4- or dorsomorphin-treated precursors were normalized for GNB2L1 mRNA content and are shown relative to GNB2L1-normalized transcription in the untreated cells. Data represent the mean \pm SD from 2 to 3 independent experiments.

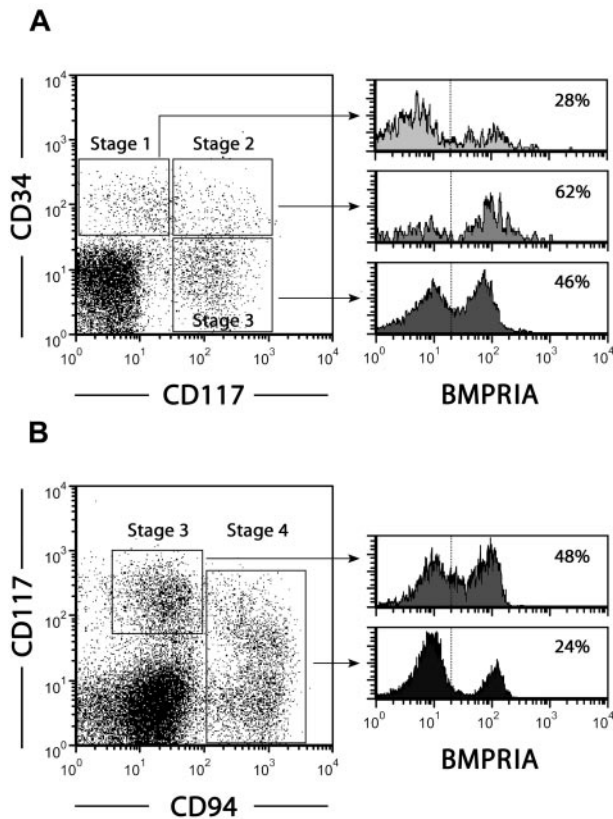


Figure 6. Expression of BMPRIA in NK cell precursors from human lymph nodes. Lymph node mononuclear cells were used to analyze BMPRIA expression on stage 1-4 NK cell precursors. (A) Dot plot shows the expression of CD34 and CD117 in Lin⁺ (CD3⁺, CD19⁺, CD14⁺, CD94⁺) cells. Histograms show BMPRIA expression on stage 1 CD34⁺ CD117⁺ CD94⁺ pro-NK cells, stage 2 CD34⁺ CD117⁺ CD94⁺ pre-NK cells and stage 3 CD34⁺ CD117⁺ CD94⁺ committed immature NK cells. The percentages of positive cells are indicated in each histogram. (B) Dot plot shows the expression of CD117 and CD94 in Lin⁺ (CD3⁺, CD19⁺, CD14⁺, CD34⁺) cells. Histograms show BMPRIA expression on stage 3 CD34⁺ CD117⁺ CD94⁺ immature NK cells and stage 4 CD34⁺ CD117⁺ CD94⁺ NK cells. The percentages of positive cells are indicated in each histogram. Data are representative of 3 independent experiments.

intrathymic cell subpopulations expressing BMP receptors, mainly BMPRIA.^{27,30} In the present report, we proposed to carry out a detailed phenotypic analysis of the subpopulation of CD34⁺ CD1a⁺ early thymocyte progenitors that express BMPRIA and therefore are able to respond to BMP signals, and we found that these cells exhibit multiple phenotypic features typical of NK cell precursors. Moreover, these intrathymic progenitor cells mostly differentiate into functionally mature NK cells not only in the presence of suitable cytokines but also under the influence of the thymic stromal microenvironment, previously claimed to mainly promote T-cell maturation.

At present, information on NK cell differentiation in the human thymus is very limited, and most existing data only investigate the NK cell potential of different precursor cell subpopulations. In line with our results, it has been reported that among intrathymic CD34⁺ CD1a⁺ cells, both CD5⁺ and CD5⁺ cell subsets have NK cell as well as T-cell potential,^{9,15} and Márquez et al identified bipotential NK/DC progenitors characterized by expression of CD116 and CD33, and low levels of CD127.^{10,11} Likewise, the analysis of CD161 expression in immature thymocytes showed that a fraction of CD161-bearing cells coexpressed CD34 and CD117, lacked CD1a expression and that they were able to generate cytolytic cells on culture with IL-2.³⁹

Recent studies have defined in human lymph nodes and tonsils a complete pathway of NK cell development starting with multipotent precursor cells (stage 1, CD34⁺ CD117⁺ CD94⁺ pro-NK cells and stage 2, CD34⁺ CD117⁺ CD94⁺ pre-NK cells) proceeding through NK-committed cells (stage 3, CD34⁺ CD117⁺ CD94⁺ immature NK cells) into mature NK cells (stage 4, CD34⁺ CD117⁺ CD94⁺ CD56⁺ cells).^{1,7} According to our results from in vitro NK cell differentiation assays and ex vivo phenotypic analyses, we favor the idea that a similar progression of developmental stages may occur during NK cell differentiation in the human thymus. The intrathymic subpopulation of CD34⁺ BMPRIA⁺ cells that we have defined here could be equivalent to CD34⁺ CD117⁺ CD94⁺ pre-NK cells. Supporting this notion, stage 2 pre-NK cells mostly express BMPRIA and share with thymic CD34⁺ BMPRIA⁺ precursors several phenotypic features, such as the expression of CD117, CD45RA, CD33, CD38, and CD44 antigens.² More interesting is the fact that the only NK cell receptor consistently expressed in pre-NK cells is CD161, which is expressed by most CD34⁺ BMPRIA⁺ precursor cells. Likewise, pre-NK cells constitute the first developmental stage acquiring the ability to respond to IL-15, which agrees with the broad expression of CD122 and CD215 detected in intrathymic CD34⁺ BMPRIA⁺ cells.^{2,7} The analyses of lineage differentiation potentials have shown that stage 2 pre-NK cells can give rise to NK cells and, to a lesser extent, T cells and DCs, indicating that this cell subset is not fully committed to NK cell lineage.⁷ Similarly, although intrathymic CD34⁺ BMPRIA⁺ precursors can generate low numbers of T cells, they mainly differentiate into NK cells, even under the influence of thymic stromal cells in FTOC. It is also likely that CD34⁺ BMPRIA⁺ cells can produce DCs because some of the bipotent NK/DC progenitors described in the human thymus^{10,11} express BMPRIA and therefore must be included in the BMPRIA⁺ precursor cell subpopulation.

The comparative gene expression analysis of BMPRIA⁺ and BMPRIA⁺ CD34⁺ cells also suggests the commitment of CD34⁺ BMPRIA⁺ precursors toward the NK cell lineage. Intrathymic CD34⁺ BMPRIA⁺ cells express higher levels of the transcription factor Nfil3 that constitutes a specific and essential requirement for the development of murine NK cells,^{33,34} and lower levels of Bcl11b, a zinc-finger transcription factor that has been demonstrated to be necessary for T-cell lineage commitment in mice, being specifically required for repression of NK cell-associated genes.^{35,36} In this context, Klein Wolterink et al have proposed that the relative expression levels of Nfil3 versus Bcl11b would be major determinants of NK versus T-cell fate decision at specific developmental cell stages.¹⁶ Id proteins, particularly Id2 and Id3, also have been shown to play an important role in the generation of NK cells.^{13,40,41} In humans, the enforced expression of Id2 or Id3 in thymic CD34⁺ CD1a⁺ progenitor cells inhibits their differentiation into T cells and concomitantly promotes NK cell development,^{13,15} agreeing with the fact that CD34⁺ BMPRIA⁺ precursors express high levels of Id3, but not Id2, which is up-regulated later. Although it has been recently reported that Id2 would be the main factor that physiologically would control the differentiation of NK cells,¹⁵ our results suggest, in accordance to previous work in mice,⁴² that Id3 and Id2 may cooperate acting sequentially during NK cell development, with Id3 functioning in NK cell precursors and Id2 in the immature to mature NK cell transition. It is also interesting to emphasize that CD34⁺ BMPRIA⁺ thymic precursor cells express high levels of GATA-2, but not GATA-3. However, the levels of this latter increase notably during NK cell differentiation, confirming previous results showing that GATA-3 is required

for the intrathymic differentiation of mouse NK cells.¹² On the basis of all these results, we can therefore conclude that the subpopulation of intrathymic CD34⁺ BMPRIA⁺ progenitors includes the thymic NK cell precursors. In addition, we also propose that the expression of BMPRIA could be used to identify NK-committed CD34⁺ precursor cells in different organs. Although further experiments will be needed, we show the first evidence that BMPRIA expression is mainly associated with stage 2 CD34⁺ CD117⁺ pre-NK cells in comparison with stage 1 CD34⁺ CD117[−] pro-NK cells in human lymph nodes.

During the in vitro differentiation of thymic CD34⁺ cells into NK cells, BMP4 is secreted to the culture medium. This evidence, along with the expression of BMPRIA in the intrathymic subpopulation of NK cell lineage-committed CD34⁺ cells, points out the relevance of an autocrine BMP signaling in NK cell development. Our results show that the BMP signaling pathway functions at several stages, both before and after the acquisition of responsiveness to IL-15, a cytokine shown to be critical for NK cell development.^{43–45}

In early stages, BMP pathway seem to promote NK cell differentiation, because the blockade of BMP signaling with the inhibitor dorsomorphin reduces the expression levels of CD122 as well as NK cell-associated transcription factors, mainly Nfil3, Id2, Id3, and Runx3. Likewise, in the absence of IL-15, the stimulation of BMP signaling up-regulates CD122, as well as Id3, Id2, and Runx3 expression in CD34⁺ cells, allowing their differentiation into immature NK cells that cannot further expand because of the lack of IL-15. Therefore, in the first steps of NK cell development, BMP signaling would be involved in producing a pool of IL-15-responsive NK cell precursors, probably by up-regulating the levels of Id2, Id3, and Runx3 transcription factors. Id proteins and Runx transcription factors are important gene targets of BMP pathway in several cell types,^{20,21,46} including human intrathymic CD34⁺ cells. Id2 and also Id3 proteins have been already involved in increasing a pool of thymic CD1a[−] CD5⁺ NK cell progenitors in humans through their ability to repress the function of E proteins, mainly HEB, that results in the inhibition of T-cell development.^{13,15} Runx3 has been reported to be dominantly expressed in NK cells from the NK precursor stage to mature NK cells and also has been shown to bind to CD122 promoter region and positively regulate CD122 expression in early stages of NK cell development.⁴⁷ Nfil3 also is regulated by BMP signaling and its action has been described to be mediated via Id2.³³

Different reports have pointed out that IL-15 plays an essential role promoting the survival, proliferation, and differentiation of committed NK precursors once they have been fully specified.^{15,16,43,48} In this context, our results show that the expression of BMPRIA is induced by IL-15 and the production of BMP-4 ligand also is increased by IL-15, indicating that IL-15 promotes autocrine BMP signaling during NK cell differentiation. Furthermore, the

inhibition of the BMP pathway decreases the IL-15-induced proliferation and survival of developing NK cells, demonstrating that BMP signaling mediates, at least in part, the effects of IL-15. Id proteins, common targets for BMP signaling, also seem to be involved in these stages because Schotte et al have reported that Id2 controls the proliferative expansion of an IL-15-responsive thymic NK precursor cell subset.¹⁵

Our data show that the BMP signaling pathway also participates in the late stages of NK cell development because the treatment with the BMP inhibitor dorsomorphin generates very low numbers of mature NK cells exhibiting reduced cytotoxicity and diminished capacity to secrete cytokines. In agreement with these results and with the fact that BMP signaling is mediating IL-15 effects, the analysis of IL-15-deficient mice as well as CD122-deficient mice overexpressing the survival factor Bcl-2 has shown that, in late stages of NK cell development, IL-15 may participate in inducing the survival of mature NK cells and the acquisition of their effector functions.^{49,50}

Taken together, our results show that the expression of BMPRIA identifies NK cell precursors in the human thymus and that unlike what has been described for T-cell development^{26–29,31} BMP signaling positively regulates the intrathymic differentiation of human NK cells.

Acknowledgments

The authors thank the Pediatric Cardiosurgery Units from Hospital Madrid-Montepíncipe and Hospital 12 de Octubre for thymus samples and the Transplant Coordination Unit from Hospital Clínico San Carlos for lymph node samples.

This work was supported by grants BFU2009-10315 and BFU2010-18250 (Ministerio de Ciencia e Innovación), RD06/0010/0003 (Instituto de Salud Carlos III), and GR35/10A-910552 (Universidad Complutense and Comunidad Autónoma de Madrid).

Authorship

Contribution: L.H. designed and performed the research and collected and analyzed data; V.G.M., J.V., C.H.-L., and M.N.V. performed research and collected data; J.R.N. provided essential materials; A.G.Z. and R.S. contributed to writing the paper; and A.Varas and A.Vicente designed the research, analyzed data, and wrote the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Angeles Vicente, Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Av Complutense s/n Complutense University, Ciudad Universitaria 28040 Madrid, Spain; e-mail: avicente@bio.ucm.es.

References

- Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood*. 2008;112(3):461–469.
- Freud AG, Caligiuri MA. Human natural killer cell development. *Immunol Rev*. 2006;214(1):56–72.
- Chinen H, Matsuoka K, Sato T, et al. Lamina propria c-kit⁺ immune precursors reside in human adult intestine and differentiate into natural killer cells. *Gastroenterology*. 2007;133(2):559–573.
- Male V, Hughes T, McClory S, Colucci F, Caligiuri MA, Moffett A. Immature NK cells, capable of producing IL-22, are present in human uterine mucosa. *J Immunol*. 2010;185(7):3913–3918.
- Vacca P, Vitale C, Montaldo E, et al. CD34⁺ hematopoietic precursors are present in human decidua and differentiate into natural killer cells upon interaction with stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(6):2402–2407.
- Moroso V, Famili F, Papazian N, et al. NK cells can generate from precursors in the adult human liver. *Eur J Immunol*. 2011;41(11):3340–3350.
- Freud AG, Yokohama A, Becknell B, et al. Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J Exp Med*. 2006;203(4):1033–1043.
- Mingari MC, Poggi A, Biassoni R, et al. In vitro proliferation and cloning of CD3[−] CD16⁺ cells from human thymocyte precursors. *J Exp Med*. 1991;174(1):21–26.
- Sánchez MJ, Spits H, Lanier LL, Phillips JH. Human natural killer cell committed thymocytes and their relation to the T cell lineage. *J Exp Med*. 1993;178(6):1857–1866.
- Márquez C, Trigueros C, Franco JM, et al. Identification of a common developmental pathway for thymic natural killer cells and dendritic cells. *Blood*. 1998;91(8):2760–2771.

11. de Yébenes VG, Carrasco YR, Ramiro AR, Toribio ML. Identification of a myeloid intrathymic pathway of dendritic cell development marked by expression of the granulocyte macrophage-colony-stimulating factor receptor. *Blood*. 2002; 99(8):2948-2956.
12. Vosshenrich CA, Garcia-Ojeda ME, Samson-Villeger SI, et al. A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. *Nat Immunol*. 2006;7(11):1217-1224.
13. Heemskerk MH, Blom B, Nolan G, et al. Inhibition of T cell and promotion of natural killer cell development by the dominant negative helix loop helix factor Id3. *J Exp Med*. 1997;186(9):1597-1602.
14. Garcia-Peydró M, de Yébenes VG, Toribio ML. Notch1 and IL-7 receptor interplay maintains proliferation of human thymic progenitors while suppressing non-T cell fates. *J Immunol*. 2006; 177(6):3711-3720.
15. Schotte R, Dontje W, Nagasawa M, et al. Synergy between IL-15 and Id2 promotes the expansion of human NK progenitor cells, which can be counteracted by the E protein HEB required to drive T cell development. *J Immunol*. 2010;184(12): 6670-6679.
16. Klein Wolterink RG, Garcia-Ojeda ME, Vosshenrich CA, Hendriks RW, Di Santo JP. The intrathymic crossroads of T and NK cell differentiation. *Immunol Rev*. 2010;238(1):126-137.
17. Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16(3):251-263.
18. Miyazono K, Kamiya Y, Morikawa M. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction. *J Biochem*. 2010;147(1):35-51.
19. Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009;20(5-6):343-355.
20. Cohen MM, Jr. Perspectives on RUNX genes: an update. *Am J Med Genet A*. 2009;149A(12):2629-2646.
21. Miyazono K, Miyazawa K. Id: a target of BMP signaling. *Sci STKE*. 2002;2002(151):pe40.
22. Bhatia M, Bonnet D, Wu D, et al. Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 1999;189(7):1139-1148.
23. Hogan BL. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev*. 1996;10(13):1580-1594.
24. Ishizuya-Oka A, Hasebe T. Sonic hedgehog and bone morphogenetic protein-4 signaling pathway involved in epithelial cell renewal along the radial axis of the intestine. *Digestion*. 2008; 77(Suppl 1):42-47.
25. Reddi AH. BMPs: from bone morphogenetic proteins to body morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16(3):249-250.
26. Varas A, Hager-Theodorides AL, Sacedon R, Vicente A, Zapata AG, Crompton T. The role of morphogens in T-cell development. *Trends Immunol*. 2003;24(4):197-206.
27. Cejalvo T, Sacedon R, Hernandez-Lopez C, et al. Bone morphogenetic protein-2/4 signalling pathway components are expressed in the human thymus and inhibit early T-cell development. *Immunology*. 2007;121(1):94-104.
28. Hager-Theodorides AL, Outram SV, Shah DK, et al. Bone morphogenetic protein 2/4 signaling regulates early thymocyte differentiation. *J Immunol*. 2002;169(10):5496-5504.
29. Tsai PT, Lee RA, Wu H. BMP4 acts upstream of FGF in modulating thymic stroma and regulating thymopoiesis. *Blood*. 2003;102(12):3947-3953.
30. Varas A, Sacedon R, Hidalgo L, et al. Interplay between BMP4 and IL-7 in human intrathymic precursor cells. *Cell Cycle*. 2009;8(24):4119-4126.
31. Graf D, Nethisinghe S, Palmer DB, Fisher AG, Merkenschlager M. The developmentally regulated expression of Twisted gastrulation reveals a role for bone morphogenetic proteins in the control of T cell development. *J Exp Med*. 2002; 196(2):163-171.
32. Valencia J, Hernandez-Lopez C, Martinez VG, et al. Transient beta-catenin stabilization modifies lineage output from human thymic CD34+CD1a+ progenitors. *J Leukoc Biol*. 2010;87(3):405-414.
33. Gascoyne DM, Long E, Veiga-Fernandes H, et al. The basic leucine zipper transcription factor E4BP4 is essential for natural killer cell development. *Nat Immunol*. 2009;10(10):1118-1124.
34. Kamizono S, Duncan GS, Seidel MG, et al. Nfil3/E4bp4 is required for the development and maturation of NK cells in vivo. *J Exp Med*. 2009; 206(13):2977-2986.
35. Li P, Burke S, Wang J, et al. Reprogramming of T cells to natural killer-like cells upon Bcl11b deletion. *Science*. 2010;329(5987):85-89.
36. Rothenberg EV, Zhang J, Li L. Multilayered specification of the T-cell lineage fate. *Immunol Rev*. 2010;238(1):150-168.
37. Yu PB, Hong CC, Sachidanandan C, et al. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat Chem Biol*. 2008;4(1):33-41.
38. Balemans W, Van Hul W. Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev Biol*. 2002;250(2):231-250.
39. Poggi A, Costa P, Morelli L, et al. Expression of human NKRP1A by CD34+ immature thymocytes: NKRP1A-mediated regulation of proliferation and cytolytic activity. *Eur J Immunol*. 1996; 26(6):1266-1272.
40. Fujimoto S, Ikawa T, Kina T, Yokota Y. Forced expression of Id2 in fetal thymic T cell progenitors allows some of their progeny to adopt NK cell fate. *Int Immunol*. 2007;19(10):1175-1182.
41. Ikawa T, Fujimoto S, Kawamoto H, Katsura Y, Yokota Y. Commitment to natural killer cells requires the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(9):5164-5169.
42. Boos MD, Yokota Y, Eberl G, Kee BL. Mature natural killer cell and lymphoid tissue-inducing cell development requires Id2-mediated suppression of E protein activity. *J Exp Med*. 2007;204(5): 1119-1130.
43. Cheng M, Charoudeh HN, Brodin P, et al. Distinct and overlapping patterns of cytokine regulation of thymic and bone marrow-derived NK cell development. *J Immunol*. 2009;182(3):1460-1468.
44. Huntington ND, Legrand N, Alves NL, et al. IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *J Exp Med*. 2009;206(1):25-34.
45. Pek EA, Chan T, Reid S, Ashkar AA. Characterization and IL-15 dependence of NK cells in humanized mice. *Immunobiology*. 2011;216(1-2): 218-224.
46. Martínez VG, Hernandez-Lopez C, Valencia J, et al. The canonical BMP signaling pathway is involved in human monocyte-derived dendritic cell maturation. *Immunol Cell Biol*. 2011;89(5): 610-618.
47. Ohno S, Sato T, Kohu K, et al. Runx proteins are involved in regulation of CD122, Ly49 family and IFN-gamma expression during NK cell differentiation. *Int Immunol*. 2008;20(1):71-79.
48. Boos MD, Ramirez K, Kee BL. Extrinsic and intrinsic regulation of early natural killer cell development. *Immunol Res*. 2008;40(3):193-207.
49. Minagawa M, Watanabe H, Miyaji C, et al. Enforced expression of Bcl-2 restores the number of NK cells, but does not rescue the impaired development of NKT cells or intraepithelial lymphocytes, in IL-2/IL-15 receptor beta-chain-deficient mice. *J Immunol*. 2002;169(8):4153-4160.
50. Vosshenrich CA, Ranson T, Samson SI, et al. Roles for common cytokine receptor gamma-chain-dependent cytokines in the generation, differentiation, and maturation of NK cell precursors and peripheral NK cells in vivo. *J Immunol*. 2005; 174(3):1213-1221.

Wnt5a Skews Dendritic Cell Differentiation to an Unconventional Phenotype with Tolerogenic Features

Jaris Valencia,* Carmen Hernández-López,* Víctor G. Martínez,* Laura Hidalgo,* Agustín G. Zapata,[†] Ángeles Vicente,* Alberto Varas,*¹ and Rosa Sacedón*¹

Dendritic cells (DCs) are critical regulators of immune responses that integrate signals from the innate and adaptive immune system and orchestrate T cell responses toward either immunity or tolerance. Growing evidence points to the Wnt signaling pathway as a pivotal piece in the immune balance and focuses on DCs as a direct target for their immunoregulatory role. Our results show that the increase in Wnt5a signaling during the differentiation of human DCs from monocytes alters their phenotype and compromises their subsequent capacity to mature in response to TLR-dependent stimuli. These Wnt5a-DCs produce scant amounts of IL-12p70 and TNF- α but increased levels of IL-10. Consequently, these Wnt5a-DCs have a reduced capacity to induce Th1 responses that promote IL-10 secretion by CD4 T cells. Changes in the transcriptional profile of Wnt5a-DCs correlate with their unconventional phenotype caused presumably by increased IL-6/IL-10 signaling during the process of DC differentiation. The effect of Wnt5a is not a consequence of β -catenin accumulation but is dependent on noncanonical Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II/NF- κ B signaling. Our results therefore suggest that under high levels of Wnt5a, typical of the inflammatory state and sepsis, monocytes could differentiate into unconventional DCs with tolerogenic features. *The Journal of Immunology*, 2011, 187: 4129–4139.

Dendritic cells (DCs) play a central role orchestrating adaptive immune responses against pathogens or cancer while maintaining tolerance to self Ags and innocuous micro-organisms or molecules. These dual-antagonistic functions are balanced by a microenvironment that affects developing DCs or signals received during DC activation. This milieu determines DC functional diversity and allows the organization of discrete DC subpopulations into different anatomical compartments, which present specific immunological requirements, and adaptation of their activities to the organism's state (1–3). Recent growing evidence points to Wnt proteins and Wnt signaling components as important modulators of the immune system that participate in the balance between tolerance and immunity and reveal DCs as one of their direct targets (4–6).

Wnt proteins are a large family of secreted proteins widely expressed during development when they are implicated in an

enormous array of processes (7). In adults, Wnt proteins regulate stem cell renewal and differentiation and modulate bone remodeling (8), adipose (9), and tissue homeostasis and hematopoiesis (10), and Wnt signaling deregulation is associated with cancer (11). Wnt proteins also have been proposed as endocrine factors involved in aging (12, 13) and septicemia (14).

To trigger a cellular response, a single Wnt ligand can simultaneously activate distinct signaling pathways (15, 16). Ultimate Wnt signaling output and biological consequences depend on both the Wnt ligand and the receptor context. Canonical signaling is initiated through a multimeric cluster of low-density receptor-related protein 5/6 (LRP5/6) and Frizzled (Fzd) receptors that recruit the cytoplasmic proteins dishevelled, axin, and glycogen synthase kinase 3 (GSK3) to the membrane. This results in LRP phosphorylation and disassembly of the β -catenin destruction complex, thus preventing constitutive phosphorylation of β -catenin by GSK3 and its subsequent proteolytic destruction. Ultimately, β -catenin accumulates in the nucleus and activates the transcription of Wnt target genes. In parallel to β -catenin transcriptional activity, canonical signaling also may influence a wider range of metabolic and signaling pathways through its inhibitory effect on GSK3 activity (17). Noncanonical signaling occurs independently of β -catenin stabilization. Fzd-activated dishevelled can associate with small GTPases, including Rac, Cdc42, and Rho. They in turn activate ROCK kinase and JNK, which remodel the cytoskeleton and promote c-Jun-regulated cell expression. Fzd–LRP receptor complexes also can signal via G proteins, which induce Ca^{2+} flux that activates calcium/calmodulin-dependent kinase II (CaMKII), protein kinase C (PKC), and subsequently NF-AT. CaMKII can lead to the activation of a nemo-like kinase, which may interfere with β -catenin transcriptional activity (15, 16). Different components of the Wnt pathway have immunomodulatory properties and are possible targets for therapeutic intervention. GSK3 inhibition has a global anti-inflammatory effect and negatively affects innate and adaptive immune responses (18, 19). Endothelial cell-derived Wnt proteins activate the β -catenin-dependent pathway necessary for optimal effector T cell transmigration (20), while inflammation makes macrophages sensitive

*Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, 28040 Madrid, Spain; and [†]Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University, 28040 Madrid, Spain

¹A.V. and R.S. contributed equally to this work.

Received for publication May 2, 2011. Accepted for publication August 5, 2011.

This work was supported by Grants BFU2009-10315 and BFU2010-18250 from the Spanish Ministry of Science and Innovation, RD06/0010/0003 from Carlos III Health Institute, and GR35/10A-910552 from Complutense University and Autonomous Community of Madrid.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Rosa Sacedón, Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Avenida Complutense s/n, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain. E-mail address: rosasacedon@med.ucm.es

The online version of this article contains supplemental material.

Abbreviations used in this article: CaMKII, Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II; CBA, Cytometric Bead Array; DC, dendritic cell; Fzd, Frizzled; GSK3, glycogen synthase kinase 3; ID, inhibitor of DNA binding; iDC, immature dendritic cell; IRF, IFN regulatory factor; LRP, low-density receptor-related protein; MFI, mean fluorescence intensity; PDL, programmed cell death ligand; PKC, protein kinase C; poly I:C, polyinosinic-polycytidylic acid; SOCS, suppressors of cytokine signaling.

Copyright © 2011 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/11/\$16.00

to Wnt3a, which in turn reduces their proinflammatory effector mechanisms (21). However, Wnt5a, considered a prototypical non-canonical Wnt protein, has been proposed as a proinflammatory signal involved in macrophage (14, 22) and endothelial (23) activation, implicated in rheumatoid arthritis pathogenesis (24), and detected in other human inflammatory diseases (22, 23).

Several studies have revealed that DCs are important targets for the immunomodulatory activity of Wnt signaling. Cooperation of the canonical Wnt pathway with Notch signal is required for the differentiation of hematopoietic progenitor cells into DCs (5). It also has been demonstrated that GSK3 activity profoundly influences DC differentiation and maturation. GSK3 inhibits the differentiation of monocytes into macrophages, thus allowing DC differentiation. In immature monocyte-derived DCs, this enzyme is constitutively active suppressing spontaneous maturation and enhancing cytokine production after CD40L- or *Escherichia coli*-dependent activation (25). Consistent with these observations, inhibition of GSK3 activity or activation of the β -catenin pathway through the disruption of E-cadherin-mediated adhesion in immature DCs (iDCs) induces a semimature tolerogenic phenotype that could correlate with the functional characteristics of the migratory DCs that reach lymph nodes in the steady state (4). More recently, Manicassamy et al. (6) revealed a role for β -catenin in the balance between immunity and tolerance in murine intestinal mucosa. Intestinal lamina propria DCs expressed Wnt ligands and Fzd receptors, and Wnt-mediated activation of β -catenin programs them to induce regulatory T cells (6).

In the present study, we show that Wnt5a impairs human monocyte-derived DC differentiation. DCs that differentiate in the presence of exogenous Wnt5a (Wnt5a-DCs) show basic phenotypic features of DCs but upon TLR stimulation produce scant amounts of IL-12 and TNF- α but higher amounts of IL-10. Consequently, these Wnt5a-DCs have a reduced capacity to induce Th1 responses that promote IL-10 secretion. We also observed that Wnt5a-DCs showed an altered transcription profile suggestive of their unconventional phenotype, focusing our interest on the signaling mechanisms by which Wnt5a alters DC differentiation.

Materials and Methods

Human monocyte differentiation

Human CD14⁺ monocytes were isolated from buffy coats (Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid, Madrid, Spain) by density gradient centrifugation and immunomagnetic cell separation using anti-CD14-conjugated microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Monocytes (>95%) were cultured in 48-well plates at a density of 1×10^6 cells per milliliter in AIMV medium supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma-Spain), 20 ng/ml GM-CSF, and 20 ng/ml IL-4 (both from Invitrogen, Carlsbad, CA), in the presence or absence of 100 ng/ml Wnt3a or Wnt5a (both from Chemicon International, Temecula, CA) for 6 d. One half of the medium was replaced every 2 d. In some experiments, GM-CSF/IL-4 monocyte cultures were treated with Wnt5a alone or Wnt5a plus specific signaling inhibitor molecules only during the first 24 h of culture, when total medium from the cultures was substituted for 24 h GM-CSF/IL-4 monocyte-conditioned medium. In the Wnt signaling inhibition assays, cells were pretreated with either G6983 (5 mM) purchased from Tocris Bioscience (Bristol, U.K.), CK59 (1–50 μ M), SP600125 (20 μ M), or JSH-23 (5–10 μ M) (from Merck KGaA, Darmstadt, Germany) for 15 min before adding Wnt5a and GM-CSF/IL-4 mixture.

FACS analysis

The following mAbs conjugated with FITC, PE, PE-Cy5, or allophycocyanin were used for flow cytometric analysis, as described previously (26): CD14 (M5E2) (Immunostep, Salamanca, Spain), CD1a (HI149), HLA-DR (G46-6), CD40 (5C3), CD80 (L307.4) (all from BD Biosciences, San Jose, CA), CD83 (HB15e), CD86 (IT2.2), CD197/CCR7 (TG8), CD205/DEC-205 (MG38), CD206/MMR (15-2), CD209/DC-SIGN(9E9A8), CD273/programmed cell death ligand 2 (PDL2) (24F.10C12), CD274/PDL1 (29E.2A3), CD324/E-cadherin (67A4) (BioLegend, San Diego, CA). For intracellular staining of phosphorylated STAT5, STAT6, and CaMKII,

cells were treated with CellFIX BD Phosflow Perm Buffer III (BD Biosciences) and stained with PE-conjugated anti-phospho-STAT5 (Tyr⁶⁹⁴) and with PE-conjugated anti-phospho-STAT6 (Tyr⁶⁴¹) (both from BD Biosciences) or with anti-phospho-CaMKII α (Thr²⁸⁶) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), followed by allophycocyanin-conjugated donkey anti-rabbit IgG (Jackson Immuno Research Laboratories). For the intracellular staining of IFN regulatory factor 1 (IRF1), IRF8, inhibitor of DNA binding 3 (ID3), suppressors of cytokine signaling 3 (SOCS3), and total β -catenin, cells were fixed and permeabilized using Cytofix/Cytoperm solution, washed with Perm/Wash buffer (BD Biosciences), and stained with specific rabbit polyclonal Abs for IRF1, IRF8, ID3, and SOCS3 (all from Santa Cruz Biotechnology) followed by allophycocyanin-conjugated donkey anti-rabbit IgG or with FITC-conjugated anti- β -catenin mAb (BD Biosciences) (14). Analyses were conducted with a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) from the Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia (Complutense University, Madrid, Spain).

Immunofluorescence analysis

For immunofluorescence analysis, monocytes were differentiated in DCs as described above but cultured in 0.8 cm² per well chamber slides (Thermo Fisher Scientific). The attached cells were fixed in situ and permeabilized using Cytofix/Cytoperm solution (BD Biosciences) and stained with mouse anti-human HLA-DR (BD Biosciences) followed by Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) and Alexa Fluor 633-conjugated phalloidin (Invitrogen). Hoechst 33258 was used as a nuclear stain (Invitrogen). Slides were mounted with Prolong Gold (Invitrogen) and examined on an Axioplan-2 microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) from the Centro de Microscopía y Citometría.

DC stimulation

At day 6 of culture, iDCs were washed to remove Wnt3a/ Wnt5a and cytokines and stimulated for 24–48 h with different TLR agonists: LPS (100 ng/ml), polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C) (12.5 μ g/ml), FSL1 (100 ng/ml), ssRNA40 (1 μ g/ml), Pam3CSK4 (250 ng/ml), or flagellin (500 ng/ml) (all from InvivoGen, San Diego, CA).

Mixed lymphocyte reaction

Different numbers of TLR-DCs were used as stimulators for allogeneic naive CD4 T cells (1.5×10^5) isolated from human peripheral blood. CD45RO⁺ CD4 T cells were labeled previously with 5 μ M CFSE (Sigma-Spain). The cocultures were performed in 96-well flat-bottom culture plates, using RPMI 1640 supplemented with 10% FCS (Invitrogen). Lymphocyte proliferation was assessed by the CFSE dilution method in CD3⁺ cells from day 7 cocultures.

Cytokine measurements

Culture supernatants of TLR-DCs and DC/T cell cocultures were harvested, and cytokine secretion was measured. Production of IL-12p70, IFN- γ , IL-10, IL-4, TNF- α , and IL-8 and IL-1 β , IL-6, IL-17a, and TGF- β were analyzed using ELISA MAX (BioLegend) and Cytometric Bead Array (CBA) assays (BD Biosciences), respectively, according to the manufacturers' instructions.

Internalization assays

Nonspecific pinocytosis or mannose receptor-mediated endocytosis was measured by incubating day 6 DCs at 37°C for 45 min with 1 mg/ml Lucifer yellow (Sigma-Aldrich) or 40-kDa FITC-dextran (100–500 μ g/ml), respectively. Control samples were treated similarly at 0°C. After incubation with the exogenous materials, fluorescence intensity was measured by flow cytometry.

Real-time quantitative RT-PCR

RNA isolation and total cDNA synthesis were performed as described previously (27) for assays for ID2, ID3, PU.1, ETS1, IRF1, IRF2, IRF3, IRF4, IRF8, SOCS1, SOCS3, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, and TLR8 (all from Applied Biosystems, Foster City, CA). GAPDH (predeveloped TaqMan) was used as an endogenous control. All of the PCR reactions were set in duplicate using the TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Amplifications, detections, and analyses were performed in a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Centro de Genómica, Complutense University, Madrid, Spain). The Δ Ct method was used for normalization to GAPDH mRNA.

Statistical analysis

Unpaired two-tailed Student *t* tests were used to compare differences. Values of $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.005$, and $p \leq 0.0005$ were considered to be statistically significant.

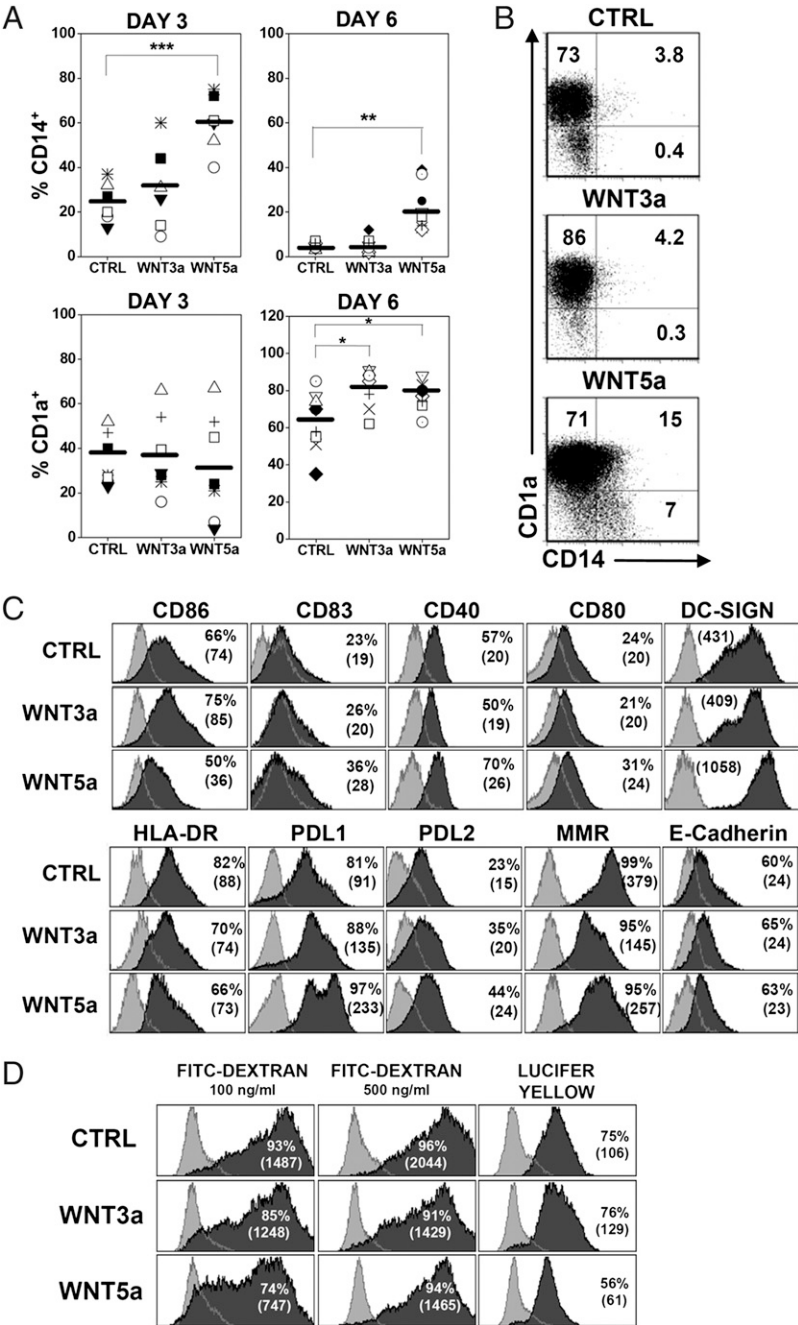
Results

Wnt proteins interfere with the differentiation of iDCs from human monocytes

We analyzed the differentiation of peripheral blood CD14 monocytes into iDCs when cultured in serum-free medium supplemented with GM-CSF/IL-4 containing either Wnt3a or Wnt5a, typically considered canonical and noncanonical Wnt ligands, respectively. The addition of Wnt proteins to the GM-CSF/IL-4 cytokine mixture did not change total cell yield or cell survival along the culture period but triggered important modifications of the DC phenotype. These effects were more profound in cells generated under the influence of exogenous Wnt5a. The addition of Wnt5a inhibited to some extent the downregulation of CD14 expression but increased, like Wnt3a, the percentage of CD1a⁺ cells in each individual donor (Fig. 1*A*, 1*B*). Thus, day 6 Wnt5a-treated cultures

yielded 10–40% of CD14^{lo} cells that expressed mostly CD1a. Further phenotypic characterization of immature Wnt5a-DCs revealed a boost in DC-SIGN, PDL1, and PDL2 levels, a slight increase in CD40 levels, and a reduction in HLA-DR, CD86, and MMR expression. E-cadherin, CD80, and CD83 levels were hardly affected. Comparatively, Wnt3a treatment exerted a lower impact on DC phenotype than Wnt5a (Fig. 1*C*, Supplemental Table I). Morphologically, we did not find differences in the forward side and scatter characteristics of cells detached from cultures (data not shown). However, in situ microscopic observation of HLA-DR immunofluorescence staining showed that, whereas control iDCs were mostly round cells, rich in lamellipodium extensions, Wnt-treated cells formed a network of adherent elongated cells, rich in filopodia extensions, a feature more evident in Wnt5a-treated cultures (Supplemental Fig. 1).

FIGURE 1. Wnt proteins alter DC differentiation from human monocytes. Human CD14⁺ monocytes were cultured for 6 d with GM-CSF/ IL-4 in either the presence or the absence of Wnt3a (100 ng/ml) or Wnt5a (100 ng/ml). *A*, The scatter plots show the percentage of CD14⁺ or CD1a⁺ cells recovered after 3 or 6 d from either control or Wnt-treated cultures (*n* = 6–8). Each symbol represents the result of a single donor, and average values are indicated with horizontal bars. *B* and *C*, Phenotypic characterization of day 6 iDCs. Dot plots show CD14 versus CD1a expression (*B*), and histograms represent expression of surface Ags (black) compared with background fluorescence (light gray) (*C*). The percentage of positive cells and the total mean fluorescence intensity (MFI) (in parentheses) are shown in each histogram. Data are representative of nine independent experiments. *D*, Uptake of soluble material by iDCs. iDCs at day 6 of culture were incubated in the presence of FITC-dextran or Lucifer yellow at 37°C, and after 45 min the internalization was measured by flow cytometry (black histograms). Control samples were treated likewise at 4°C (light gray histograms). Data are representative of three independent experiments. **p* ≤ 0.05, ***p* ≤ 0.005, ****p* ≤ 0.0005, by unpaired *t* test.



Immature DCs have the ability to internalize Ags avidly through a variety of mechanisms, including specific receptor-mediated endocytosis and nonspecific uptake by constitutive macropinocytosis. Wnt-DCs were less efficient in specific dextran uptake, which correlated with their lower expression of MMR. We also found a decrease in nonspecific fluid phase endocytosis by Wnt5a-DCs (measured as uptake of Lucifer yellow) (Fig. 1D, Supplemental Table I)

Wnt-DCs show an altered response to TLR ligands

Cells differentiated in the presence of Wnt proteins were analyzed for their phenotypic maturation and cytokine profile after activation

by TLR stimuli. These experiments were performed in the absence of exogenous Wnt proteins. Our results showed that the capacity of Wnt-DCs to mature after TLR ligation was altered. In general terms, Wnt5a-DCs were more affected than Wnt3a-DCs. Upon TLR4–LPS stimulation, Wnt5a-DCs did not properly upregulate CD83, HLA-DR, CD40, CD86, CD80, and CCR7 molecules. In contrast, in response to LPS, Wnt5a-DCs increased the expression of the inhibitory ligands PDL1 and PDL2 like control DCs did, which could promote inhibitory output during their interaction with T cells (Fig. 2A, Supplemental Table II). The phenotypic maturation of Wnt5a-DCs triggered by other bacterial TLR ligands, TLR2/1–Pam3CSK4, and TLR5–flagellin stimuli were

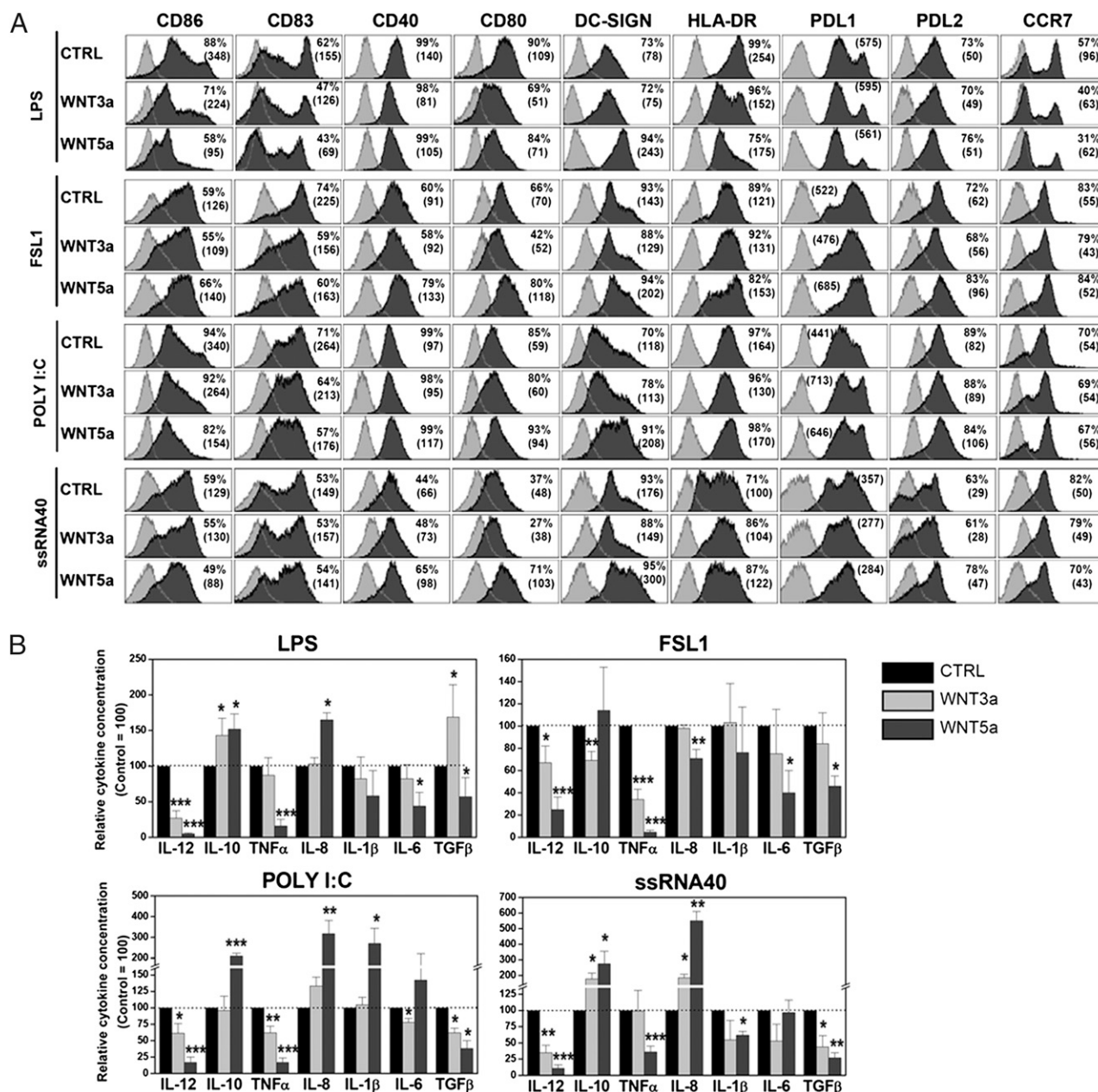


FIGURE 2. Response of Wnt-DCs to TLR ligands. Day 6 iDCs differentiated in the presence or absence of Wnt proteins were stimulated for 24–48 h with different TLR agonists (LPS, FSL1, poly I:C, and ssRNA40). Culture medium was replaced gently before adding the stimuli to avoid the influence of Wnt treatment. *A*, Histograms show the expression of surface molecules (black) analyzed by flow cytometry after 24 h of TLR stimulation. The percentage of positive cells, determined according to background staining (light gray), and the total MFI (in parentheses) are shown in each histogram. Data are representative of five independent experiments. *B*, Culture supernatants of TLR DCs were collected 48 h after stimulation. The supernatants were analyzed for IL-12p70, IL-10, TNF-α, and IL-8 by ELISA and IL-1β, IL-6, and TGF-β by CBA assays. Note the y-axis break and scale change at break. Data represent the mean (±SD) of five to nine independent experiments, expressed relative to individual controls (black bars, referred to as 100%). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$, by unpaired t test.

affected like the TLR4 response (data not shown). The response of Wnt-DCs to the synthetic lipoprotein FSL1, which signals through TLR2/6 dimers, or to viral TLR ligands, such as poly I:C/TLR3 and ssRNA40/TLR8, also was assayed, and the effects observed were less remarkable (Fig. 2A, Supplemental Table II). Nevertheless, as compared with their control counterparts, only FSL1-stimulated Wnt5a-DCs properly upregulated CD86 expression, and PDL1 or PDL2 expression was increased in Wnt5a-DCs after these stimuli.

Because cytokine production by activated DCs plays a critical role in the differentiation of primed T cells, we assessed by protein ELISA or CBA assays the capacity of Wnt-DCs to secrete diverse cytokines. Wnt-DCs produced significantly lower levels of pro-Th1 cytokines IL-12p70 and TNF- α than control DCs while the secretion of IL-10 regulatory cytokines was increased, the latter after all of the stimuli with the exception of FSL1 stimulation. Accordingly, the IL-10/IL-12 ratio increased, which could impair the capacity of Wnt-DCs to polarize naive T cells into Th1 clones. We also found differences in the capacity of Wnt-DCs to secrete other cytokines such as IL-8, IL-6, IL-1 β , and TGF- β , but the effects were dependent on TLR stimulus and/or Wnt ligand treatment (Fig. 2B).

Wnt5a-DCs stimulated through TLR are poor allostimulators that promote IL-10 secretion by naive T cells

DCs stimulated with TLR agonists were cultured in MLR with naive CD4⁺ T cells to analyze their allostimulatory capacity. Apart from DCs matured by poly I:C, TLR-stimulated Wnt-DCs in-

duced a lower proliferative response of T cells than their control counterparts. The ability of DCs to polarize naive T cells was determined by analyzing cytokine levels in day 7 MLR supernatants. Control DCs were able to efficiently polarize Th1 responses but failed to induce Th2 or Th17 responses, thus leading to consistent levels of IFN- γ detected in MLR supernatants and low and undetectable levels of IL-4 and of IL-17 α , respectively. Naive CD4⁺ T cells primed with TLR-stimulated Wnt5a-DCs produced lower amounts of IFN- γ and TNF- α but increased the secretion of IL-10, IL-8, and IL-6, the latter two only after some of the TLR stimuli. No differences were found in the secretion of IL-4 or IL-17 α (data not shown). With respect to Wnt3a-DCs, cytokine levels detected in these MLR supernatants were not significantly different from those found in their individual controls (Fig. 3).

Changes in the transcription profile account for the impaired function of Wnt5a-DCs

Downregulation of TLR expression might account for the impaired response of Wnt-DCs to TLR stimuli. Comparative real-time PCR analysis in immature control and Wnt-DCs showed that TLR3, TLR4, and TLR5 genes were transcribed in Wnt-DCs at significantly lower levels than those in their individual controls, which agrees with their inadequate response upon stimulation with poly I:C, LPS, and flagellin, respectively. However, although the response of Wnt5a-DCs to Pam3CSK4, FSL1, or ssRNA40 also was affected, we did not find significant changes in TLR2, TLR6, or TLR8 transcript levels, and we observed an increase of TLR1

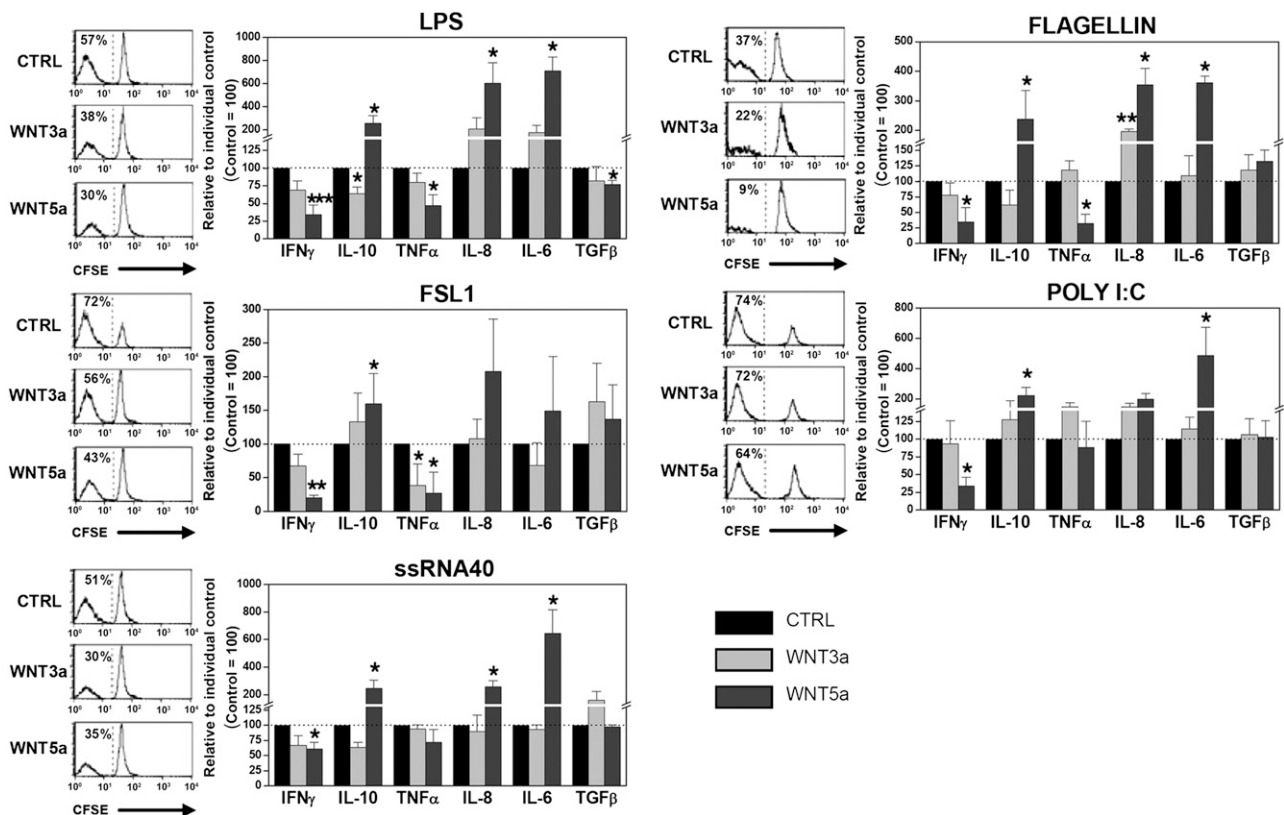


FIGURE 3. TLR-stimulated Wnt5a-DCs show lower allostimulatory capacity and promote IL-10 secretion by naive T cells. DCs stimulated with TLR agonists were cultured in MLR with CFSE-labeled allogeneic naive CD4⁺ T cells at a 1:10 DC/T cell ratio. After 7 d, lymphocytes were harvested, and the percentage of proliferating cells was calculated by the CFSE dilution method (gated on the CD3⁺ cell population). Histograms show the percentage of cells with ≥ 1 cycle of division (using T cells cultured in the absence of stimulation as controls). Data are representative of at least three independent experiments. Supernatants of DC/T cell cocultures were harvested at day 7, and the amounts of IFN- γ , IL-10, TNF- α , IL-8, IL-6, and TGF- β were tested. Data represent the mean (\pm SD) of six to nine independent experiments, expressed relative to individual controls (black bars; referred to as 100%). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$, by unpaired t test.

transcription in Wnt5a-DCs (Fig. 4A). We therefore investigated whether other mechanisms irrespective of TLR expression also could determine the functional characteristics of Wnt-DCs.

An analysis of mRNA levels for several transcriptional regulators revealed that immature Wnt5a-DCs expressed lower levels of ID2 and IRF8, an essential regulator of IL-12 expression, and showed higher amounts of IRF1 and IRF2 transcripts. IRF1 and IRF8 are critical for IL-12 transcription (28), and consequently their transcription was induced in control DCs after LPS stimulus (6- to 14-fold increase). Wnt5a-DCs failed to properly upregulate the expression of both genes after LPS stimulation (Fig. 4C), which led to lower IRF8 and IRF1 protein levels (Fig. 4D). Interestingly, Wnt-DCs showed higher levels of ID3 and SOCS3 expression (Fig. 4B, 4E).

Wnt5a diminishes the response of monocytes to the GM-CSF/IL-4 cytokine mixture and alters the DC differentiation genetic program

Because the outcome of in vitro monocyte differentiation into DCs ultimately depends on efficient GM-CSF and IL-4 signaling, we examined the phosphorylation of STAT5 and STAT6 in monocytes treated with Wnt5a or Wnt3a. Treatment of monocytes with Wnt proteins resulted in significant but partial inhibition of both STAT5 and STAT6 phosphorylation. These inhibitory effects became evident within the time frame between 2 and 20 h of cell culture, which suggests that they are a secondary effect of Wnt signaling (Fig. 5A). We found that Wnt treatment induced SOCS3, but not SOCS1, expression during the first hours of culture (Fig. 5B). SOCS3 showed the highest transcription in Wnt5a-treated cultures at 3 h (Fig. 5B) but as mentioned above remained high in day 6 iDCs (Fig. 4B).

During the first hours of monocyte culture, GM-CSF/IL-4 signaling triggers a genetic program that leads to DC development, inducing drastic changes in the expression of several regulatory

proteins and transcription factors critical for DC differentiation (Fig. 5C). In agreement with a modulatory, but not blocking, effect of Wnt5a in DC differentiation, we found normal regulation of most of these genes during the first hours of culture. Nevertheless, Wnt5a treatment blocked the important reduction of ID2 transcription observed in control monocytes during the first 3 h of culture and partially inhibited the upregulation of IRF3 and PU.1 gene expression that occurred in the following 17 h. During this period, Wnt5a treatment also induced a decrease in IRF8 transcription, which, as described above, remained lower than that in controls in day 6 iDCs (Fig. 4B).

The foregoing results are consistent with an early effect of Wnt5a signaling on DC differentiation. Consequently, we observed that the addition of Wnt5a only during the first 24 h of culture was sufficient to exert most of its effects (Fig. 5D–F). Monocytes that begin to differentiate into DCs in an environment rich in Wnt5a therefore would differentiate into functionally impaired DCs independently of later Wnt5a signaling.

Wnt signaling induces the secretion of IL-6, IL-10, and TNF- α by monocytes

Monocytes could respond to Wnt5a by secreting cytokines such as IL-6 or IL-10 that can interfere with DC differentiation. Supernatants from Wnt5a-treated cultures contained extremely high amounts of IL-6 and IL-10 cytokines compared with those of their control counterparts (Fig. 6A). Again, the effects of Wnt5a were significantly higher than those of Wnt3a. The induction of IL-6 secretion by Wnt5a was evident after 3 h of culture and peaked at 24 h (Fig. 6B). IL-10 secretion began later than that of IL-6 and was evident only after the overnight culture period. After this initial boost of IL-6 and IL-10 secretion in Wnt-treated cultures, cytokine levels remained higher until day 6 (data not shown). In the absence of the GM-CSF/IL-4 mixture, monocytes treated with Wnt5a doubled IL-6 and IL-10 secretion (data not shown). This

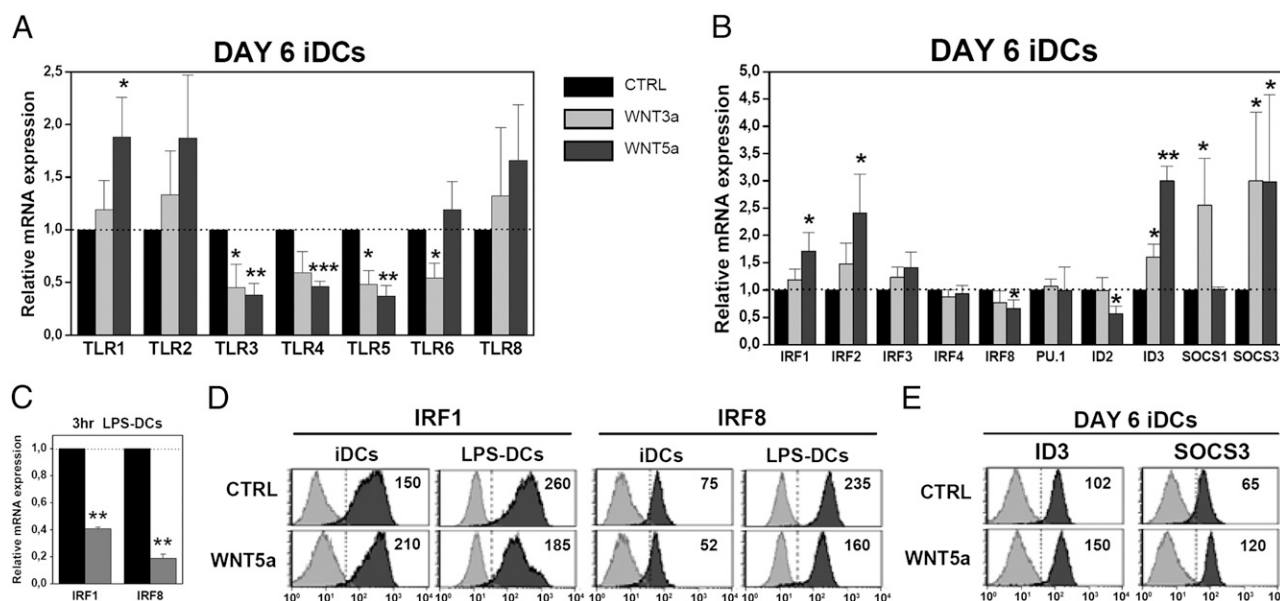


FIGURE 4. Changes in the transcription profile of Wnt5a-DCs correlate with their unconventional phenotype. *A* and *B*, Real-time PCR quantification of mRNA levels in day 6 iDCs differentiated from monocytes in the presence or absence of Wnt proteins. mRNA expression of different TLRs (*A*) and transcriptional factors and regulatory proteins (*B*) in Wnt-DCs are expressed relative to individual control values (black bars; referred to as 1). *C*, Control and Wnt5a-DCs were stimulated with LPS for 3 h, and IRF1 and IRF8 mRNA expression was analyzed. Variations between samples were corrected by normalizing against the expression of GAPDH, which was used as an endogenous control. Data represent the mean (\pm SD) of three to five independent experiments. *D* and *E*, Intracellular IRF1, IRF8 (*D*), ID3, and SOCS3 (*E*) protein levels were analyzed by flow cytometry in control and Wnt5a day 6 iDCs or after 20 h of LPS stimulation. The total MFI (in parentheses) is shown in each histogram. Data are representative of three independent experiments. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$, by unpaired t test.

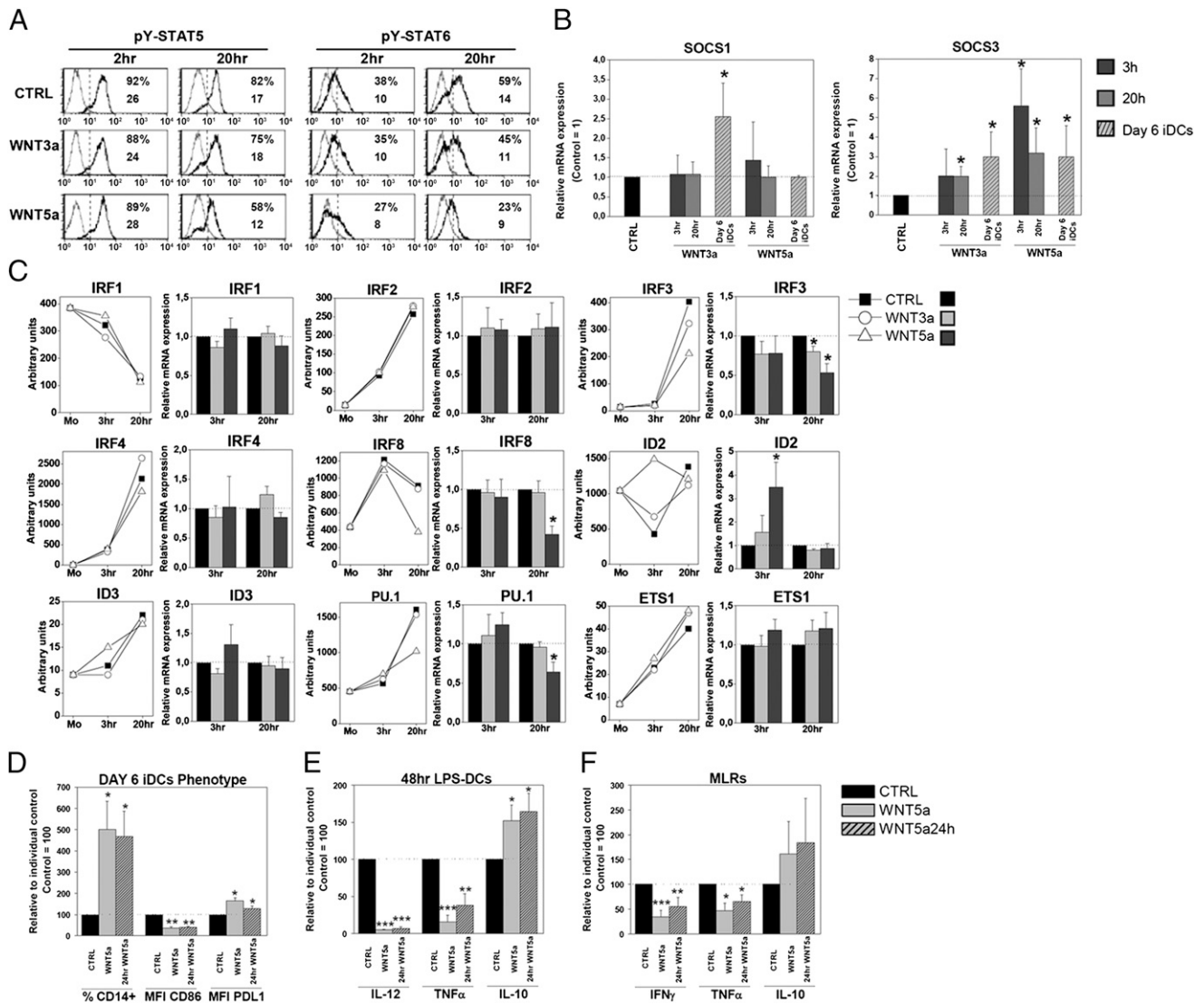


FIGURE 5. Wnt5a interferes with GM-CSF/IL-4 cytokine signaling and modified the early DC differentiation program. Human CD14⁺ monocytes were cultured with GM-CSF/IL-4 in either the presence or the absence of Wnt3a or Wnt5a. **A**, After 2 or 20 h of culture, intracellular STAT5 and STAT6 tyrosine phosphorylation levels were analyzed by flow cytometry. The percentage of positive cells, determined according to background staining (gray histograms), and the total MFI are shown in each histogram. Data are representative of four independent experiments. **B**, SOCS1 and SOCS3 expression was analyzed by quantitative RT-PCR analysis during Wnt-DC differentiation (3 and 20 h of culture and day 6 iDCs). Data shown are relative to individual control values (black; set as 1). **C**, Monocytes were cultured as indicated for 0 (monocyte, Mo), 3, or 20 h, and the expression of several transcription factors and regulatory proteins were analyzed by quantitative RT-PCR. Line graphs represent the kinetics of mRNA expression in control (black squares), Wnt3a (open circles), or Wnt5a (open triangles) cultures; data are representative of three independent experiments. Bar graphs show transcription levels relative to individual control values (black bar; referred to as 1). Data represent the mean (\pm SD) of four independent experiments. Variations between samples were corrected by normalizing against the expression of GAPDH, which was used as an endogenous control. **D–F**, The first 24 h of culture are sufficient for inducing Wnt5a effects in DC differentiation. Human CD14⁺ monocytes were cultured in the GM-CSF/IL-4 cytokine mixture as described above. Wnt5a was added to the DC differentiation culture (Wnt5a-DCs) or during just the first 24 h (24 h-Wnt5a-DCs). To remove Wnt5a, culture medium was replaced with 24 h GM-CSF/IL-4 monocyte-conditioned medium. Both control and Wnt5a cultures underwent an equivalent process. **D**, Flow cytometry analysis of day 6 iDCs. The percentage of CD14⁺ cells and the mean fluorescence values of CD86 and PDL1 are shown for Wnt5a and 24 h-Wnt5a-DCs relative to those of control iDCs cultures. **E**, Control, Wnt5a, and 24 h-Wnt5a-DCs were stimulated with LPS for 48 h. Production of IL-12p70, TNF- α , and IL-10 in culture supernatants was quantified by ELISA. **F**, Cytokine production of primed T cells. DCs stimulated with LPS were cultured in MLR with naive CD4⁺ T cells at a 1:10 DC/T cell ratio. Supernatants of DC/T cell cocultures were harvested at day 7, and the levels of IFN- γ , TNF- α , and IL-10 were tested by ELISA. Data represent the mean (\pm SD) of four to five independent experiments, expressed relative to individual controls (black bars; referred to as 100%). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$, by unpaired t test.

suggests that signals inducing DC differentiation could inhibit monocyte response to Wnt5a. Remarkably, iDCs and cord blood-derived CD14⁺ cells did not secrete IL-6 or IL-10 in response to the same dose of Wnt5a, thus suggesting that this response was specific to monocytes (J. Valencia and R. Sacedón, unpublished observations).

In contrast with the effects observed after Wnt5a treatment, the addition of high doses of IL-6 (100 ng/ml) to GM-CSF/IL-4 monocyte cultures have been proven to skew monocyte differentiation to macrophages that maintain CD14 expression but lack CD1a (29). However, simultaneous addition of TNF- α may overcome IL-6-driven macrophage differentiation by inhibiting

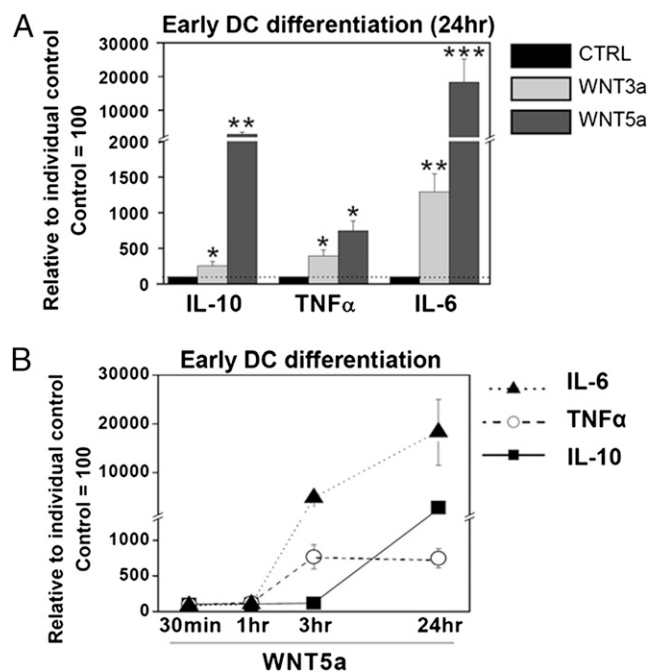


FIGURE 6. Wnt signaling induces IL-6, IL-10, and TNF- α secretion during early DC differentiation. Human CD14⁺ monocytes were cultured with GM-CSF/IL-4 in the presence or absence of Wnt3a or Wnt5a. **A**, After 24 h of culture, supernatants were harvested and analyzed for IL-6, IL-10, and TNF- α . Absolute cytokine levels of control cultures: IL-6, 77.4 \pm 22 pg/ml; IL-10, 9 \pm 4 pg/ml; TNF- α , 117 \pm 41 pg/ml. Data represent the mean (\pm SD) of four independent experiments, expressed relative to individual control (black bars; referred to as 100%). **B**, Kinetic cytokine production. Supernatants of Wnt5a-DC cultures were harvested at 30 min, 1, 3, and 24 h, and the levels of IL-6, IL-10, and TNF- α were tested. Data represent the mean (\pm SD) of three independent experiments, expressed relative to individual control (referred to as 100%). Note the y-axis break and scale change at break. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$, by unpaired t test.

M-CSF signaling in monocytes (30). We therefore analyze TNF- α in DC differentiating cultures and observe that Wnt proteins also promoted TNF- α secretion, which may redirect DC differentiation (Fig. 6A, 6B).

Noncanonical signaling mediates Wnt5a response in monocytes

We next analyzed the signaling mechanisms by which Wnt5a altered DC differentiation. Central to the Wnt canonical pathway is the stabilization of β -catenin protein through the inhibition of GSK3. Using flow cytometry, we observed that the levels of β -catenin increased in human monocytes after 3 h of DC differentiation culture but decreased during the following 20 h. The addition of Wnt5a to monocyte cultures interfered with β -catenin accumulation and reduced its levels with respect to their individual controls (Fig. 7A), thus suggesting that Wnt5a effects could be independent of β -catenin transcriptional activities. In support of this possibility, stabilization of β -catenin by LiCl treatment of GM-CSF/IL-4 monocyte cultures did not mimic Wnt5a effects (25) (Supplemental Fig. 2).

Alternatively, through a noncanonical pathway, Wnt5a can stimulate intracellular Ca²⁺ mobilization, which acts as a secondary messenger and can trigger CaMKII activation (31). Supporting this option, we demonstrated by flow cytometry that, although control cultures showed a basal level of CaMKII activation, Wnt5a induced a higher percentage and intensity mean values for phos-

pho-CaMKII α (Thr²⁸⁶) staining (Fig. 7B). We next checked whether the specific inhibition of CaMKII by CK59 could rescue DC differentiation and function after Wnt5a treatment. To this purpose, we restricted the treatments (Wnt5a alone or with the specific inhibitor) to the first 24 h of differentiation cultures, thus avoiding the possible toxic effects of a longer treatment with the CaMKII inhibitor. We followed this procedure with all of the inhibitors used. We found that, in a dose-dependent manner, CK59 almost blocked monocyte cytokine secretion induced by Wnt5a during the first hours of the GM-CSF/IL-4 cultures (Fig. 7C) and restored several of the phenotypic (data not shown) and functional (Fig. 7E) alterations found in Wnt5a-DCs. However, CaMKII inhibition did not recover IL-12/TNF- α production by Wnt5a-DCs after LPS stimulation (Fig. 7D). This observation suggests that Wnt5a signaling also may activate alternative pathways.

As a consequence of intracellular Ca²⁺ mobilization, concomitantly with CaMKII activation, Wnt5a signaling can switch on PKC and, independently of Ca²⁺, can signal via JNK (15, 16). A JNK-specific inhibitor (SP600125) did not reduce the amount of IL-6 secreted by monocytes in response to Wnt5a but increased that of IL-10 (Fig. 7F). The inhibition of PKC (Go6983) was able to reduce IL-6 in supernatants from monocytes treated with Wnt5a but drastically increased IL-10 secretion (Fig. 7F). Accordingly, these inhibitors did not recover IL-12 and TNF- α secretion by Wnt5a-DCs (data not shown). Wnt5a also could activate NF- κ B activity (23, 32) through an incompletely understood mechanism. Inhibition of NF- κ B significantly reduced the secretion of cytokines by monocytes in response to Wnt5a and restored IL-12 secretion by Wnt5a-DCs, thus demonstrating a role for NF- κ B in the effect of Wnt5a (Fig. 7F, 7G).

Discussion

In this report, we demonstrate that the increase in Wnt5a signaling during the differentiation of DCs compromises their functional capabilities. Wnt5a does not block the generation of DCs from monocytes but induces irreversible changes in their genetic differentiation program, thus leading to phenotypically altered DCs that present a lower capacity to uptake Ags and show an altered response to TLR ligands. Wnt5a-DCs stimulated via TLR produce scant amounts of IL-12p70 and TNF- α but increased amounts of IL-10. They have a reduced allostimulatory capacity and lead to less IFN- γ production but higher IL-10 secretion in MLR assays. The transcriptional profile of Wnt5a-DCs reveals changes that could account for their functional failures, presumably related in part with the high autocrine IL-6 and IL-10 signaling during the process of DC differentiation. The effect of Wnt5a is not dependent on β -catenin accumulation but is driven by Ca²⁺-dependent noncanonical signaling, and inhibition of CaMKII and NF- κ B activation restores normal DC differentiation despite Wnt5a treatment.

The effects of canonical Wnt3a on DC differentiation are not opposite to those exerted by Wnt5a, a prototypical Wnt for noncanonical signaling. On the contrary, there are some concordances between both treatments, although Wnt3a is not able to induce most of the changes found after Wnt5a treatment or its effects are less strong. This suggests a low level of signaling potency for Wnt3a on human monocytes. Wnt signaling output is dependent on both Wnt ligand and receptor context, and the same receptor complex, through dishevelled activation, can activate two (or more) routes in parallel (15, 16). Normally, a cell population expresses a mixture of Wnt receptors, and it is difficult to forecast ultimate Wnt signaling output. Human monocytes express LRP6 (33) and several Fzd (Fzd1, Fzd4, Fzd5, and Fzd7) (34) receptors. Monocyte culture induces an initial β -catenin stabilization, probably induced

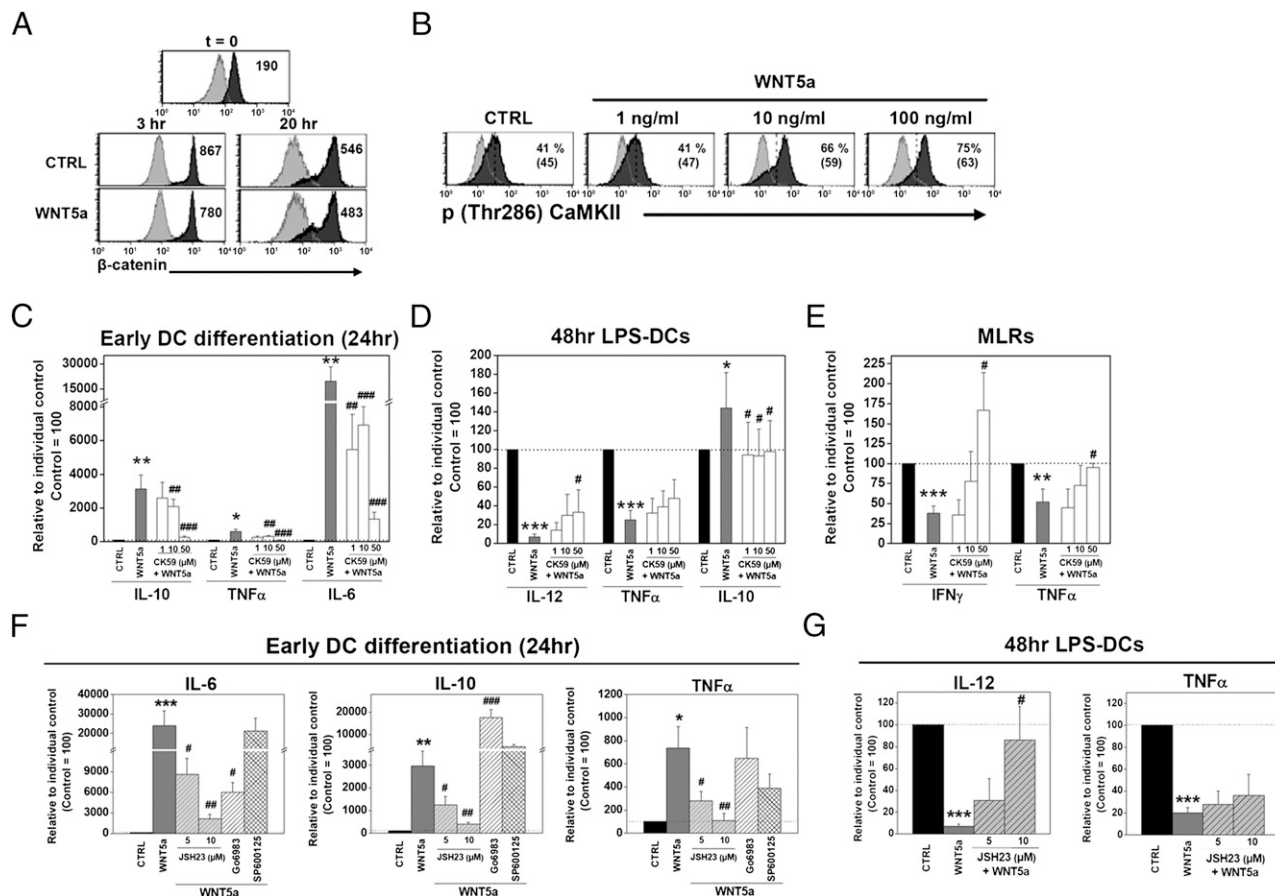


FIGURE 7. Wnt5a signals in monocytes through a noncanonical pathway. Human CD14⁺ monocytes were cultured in the GM-CSF/IL-4 cytokine mixture as described above. **A**, Intracellular levels of β -catenin were determined by flow cytometry in monocytes and after 3 or 20 h of culture with or without Wnt5a. Total MFI is shown in each histogram. Data are representative of four independent experiments. **B**, Intracellular phospho-CaMKII α (Thr²⁸⁶) levels were analyzed by flow cytometry after 1 h under control conditions or in the presence of increasing doses of Wnt5a (1, 10, or 100 ng/ml). The percentage of positive cells, determined according to background staining (light gray), and the total MFI (in parentheses) are shown in each histogram. Data are representative of three independent experiments. **C–G**, Human CD14⁺ monocytes were differentiated into DCs in the presence of Wnt5a plus different doses of specific inhibitors for CaMKII (CK59; 1–50 μ M), NF- κ B (JSH-23; 5–10 μ M), PKC (Go6983; 5 μ M), or JNK (SP600125; 20 μ M). After 24 h of GM-CSF/IL-4 culture, treatments were removed, and culture medium was replaced by 24 h GM-CSF/IL-4 monocyte-conditioned medium. Both control and treated cultures underwent an equivalent process. Supernatants from 24 h GM-CSF/IL-4 cultured monocytes (**C**, **F**), 48 h LPS-stimulated DCs (**D**, **G**), and MLR cultures established with LPS DCs (as described above) (**E**) were harvested, and the amounts of different cytokines were analyzed. Data represent the mean (\pm SD) of three to four independent experiments, expressed relative to individual control (black bars; referred to as 100%). * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.005$, *** $p \leq 0.0005$, significance relative to control nontreated cultures by unpaired t test. # $p \leq 0.05$, ## $p \leq 0.005$, ### $p \leq 0.0005$, significance relative to Wnt5a-DCs by unpaired t test.

by the adhesion process (35), although later, presumably as a response to DC differentiation signals, the levels of β -catenin decrease. In fact, GSK3 activity is crucial for the differentiation of monocytes into DCs and prevents their deviation to macrophage lineage (25) (results reported in this article), and the GM-CSF/IL-4 cytokine mixture should induce its activation. In our cultures, Wnt5a does not increase β -catenin over control values; rather, on the contrary, we observed that it causes a slight decrease. Indeed, Wnt5a has been demonstrated to antagonize the canonical Wnt pathway and promote β -catenin degradation independently of GSK3 activity in fibroblasts, hematopoietic stem cells, and cancer cells (36, 37). Alternatively to the Wnt/ β -catenin pathway, our current results indicate that monocytes respond to Wnt5a through a noncanonical Ca²⁺-dependent pathway that increases CaMKII activity and NF- κ B, a signaling route that shares common features with TLR-mediated activation (38, 39), which has been demonstrated to block DC differentiation (40, 41). Wnt5a also activates this noncanonical pathway in macrophages and endothelium and triggers a proinflammatory response (14, 23). Similarly, our results

show that monocytes are stimulated by Wnt5a to secrete proinflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α but also IL-10, which, in part, could mediate Wnt5a effects on DC differentiation.

DCs play a dual role in governing T cell responses. Depending on their functional capabilities, DCs can stimulate or suppress immune reactions. Their ability to acquire immunostimulatory features in response to exogenous stimuli, such as TLR ligation, is crucial to mediate the interplay between innate and adaptive immune responses against pathogens, because immature or partially mature DCs may exert a tolerogenic or immunosuppressive effect. Accordingly, tolerogenic DCs generated *in vitro* do not mature properly in response to TLR stimuli and are characterized by lower IL-12 secretion and increased IL-10 production like Wnt5a-DCs (42, 43). Hyporesponsiveness of Wnt5a-DCs to stimuli via TLR could underlie part of their functional defects. However, although Wnt5a-DCs show lower expression of TLR3, TLR4, and TLR5 than control DCs, we found higher or normal levels of TLR1, TLR2, TLR6, and TLR8 transcripts. The higher expression of SOCS3 observed in Wnt5a-DCs also can interfere with their stim-

ulation, because it abrogates the cytokine Jak-Stat signal transduction pathway (44). Analogous with our results, SOCS3 overexpressing DCs secrete low amounts of IL-12 but high levels of IL-10 and show a tolerogenic phenotype (45). Expression of SOCS3 has been proven to be induced by different cytokines, including IL-6 and IL-10 (44), which were increased during DC differentiation in the presence of Wnt5a. High IL-10 signaling during DC differentiation also could be one of the causes for increased ID3 expression in Wnt5a-DCs, which in turn would account for the higher capacity of Wnt5a-DCs to secrete IL-10. In support of this hypothesis, IL-10 signaling increases ID3 expression, and ID3 overexpression enhanced IL-10 production in CD14⁺ monocytes, thus establishing a positive feedback in the regulation of these genes (46). In agreement, high ID3 expression is characteristic of TGF- β /IL-4 activated M2 macrophages that express increased levels of IL-10 (47). Another feature of Wnt5a-DCs previously reported in tolerogenic DCs is their reduced expression of ID2 (42), although its functional significance remains elusive. In any case, the most remarkable characteristic of Wnt5a-DCs is their failure to secrete IL-12 in response to all of the TLR stimuli assayed, even those that lead to normal CD83 expression. Higher SOCS3 expression or the IL-10/ID3 signaling loop may interfere with IL-12 expression. Indeed, Wnt5a-DCs failed to properly increase IRF1 and IRF8 transcription after stimulation, two positive and essential factors for priming IL-12 secretion (28).

Recent reports reveal that the Wnt signaling pathway components have a role during the differentiation of DCs and shape their functional features. However, their involvement seems to be complex and dependent on developmental stage and/or DC lineage. In support of a positive effect for canonical Wnt signaling on DC differentiation and function, Zhou et al. (5) show that the addition of Wnt3a or the inhibition of GSK3 increase the proportion of DCs recovered from hematopoietic progenitor cell cultures and promote their allostimulatory capacity, while β -catenin deletion has the opposite effect. Nevertheless, GSK3 inhibition blocks the differentiation of monocytes into DCs, (25) and transient β -catenin stabilization reduces the capacity of human thymic progenitors to yield DCs (27). However, GSK3 activity is necessary to avoid spontaneous but abnormal maturation of DCs (4, 25), and specific knockout of the β -catenin gene after CD11c expression in DCs disrupts intestinal immunotolerance, enhancing the onset of inflammatory bowel diseases (6).

In vivo Wnt5a levels increase under numerous proinflammatory situations. Monocytes and macrophages upregulate Wnt5a secretion in response to different bacterial stimuli, thus increasing Wnt5a levels in the sera from patients with sepsis (14). Wnt5a also is detected in human inflammatory diseases such as granulomatous lesions from patients infected with *Mycobacterium tuberculosis* (22), atherosclerotic plaques, and rheumatoid arthritis but not in normal tissue (23). Under these conditions, monocytes could respond to Wnt5a, and this could interfere with their differentiation into DCs, resulting in an in vivo effect similar to that shown in this article. Accordingly, Wnt5a might contribute to the attenuation of inflammatory responses or to chronic bacterial infection that negatively affect the function of DCs that differentiate after the onset of the inflammatory process. Likewise, Wnt5a also could be a factor that contributes to the observed dysfunction of DCs that develops during polymicrobial sepsis that impairs the resolution of secondary infections (48). Nevertheless, the local concentrations of soluble inhibitors for Wnt5a or additional and unknown signals produced during the inflammatory process could override Wnt5a-negative effects, allowing normal DC development. Indeed, monocyte-derived DCs develop under inflammatory conditions (49, 50), and our results indicate that the GM-

CSF/IL-4 cytokine mixture attenuates the response of monocytes to Wnt5a.

In conclusion, Wnt5a is produced under inflammatory conditions and exerts a proinflammatory role acting on macrophages or endothelium (14, 22, 23). However, our results suggest that this Wnt protein also could activate monocytes and that this would interfere with the DC differentiation program, thus leading to unconventional DCs with tolerogenic features. Further research is necessary to determine in vivo factors that drive monocyte-derived DC differentiation under high concentrations of Wnt5a that are typical of the inflammatory state or bacterial infection. The identification of such a signaling milieu could upgrade the design of more effective immunotherapeutic strategies for the treatment of infection and sepsis.

Acknowledgments

We thank the Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid for providing buffy coat samples.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Coquerelle, C., and M. Moser. 2010. DC subsets in positive and negative regulation of immunity. *Immunol. Rev.* 234: 317–334.
- Ueno, H., N. Schmitt, E. Klechevsky, A. Pedroza-Gonzalez, T. Matsui, G. Zurawski, S. Oh, J. Fay, V. Pascual, J. Banchereau, and K. Palucka. 2010. Harnessing human dendritic cell subsets for medicine. *Immunol. Rev.* 234: 199–212.
- Naik, S. H. 2008. Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little. *Immunol. Cell Biol.* 86: 439–452.
- Jiang, A., O. Bloom, S. Ono, W. Cui, J. Unternaehrer, S. Jiang, J. A. Whitney, J. Connolly, J. Banchereau, and I. Mellman. 2007. Disruption of E-cadherin-mediated adhesion induces a functionally distinct pathway of dendritic cell maturation. *Immunity* 27: 610–624.
- Zhou, J., P. Cheng, J. I. Youn, M. J. Cotter, and D. I. Gabrilovich. 2009. Notch and wingless signaling cooperate in regulation of dendritic cell differentiation. *Immunity* 30: 845–859.
- Manicassamy, S., B. Reizis, R. Ravindran, H. Nakaya, R. M. Salazar-Gonzalez, Y. C. Wang, and B. Pulendran. 2010. Activation of beta-catenin in dendritic cells regulates immunity versus tolerance in the intestine. *Science* 329: 849–853.
- van Amerongen, R., and R. Nusse. 2009. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* 136: 3205–3214.
- Hoeppner, L. H., F. J. Secreto, and J. J. Westendorf. 2009. Wnt signaling as a therapeutic target for bone diseases. *Expert Opin. Ther. Targets* 13: 485–496.
- Ouchi, N., A. Higuchi, K. Ohashi, Y. Oshima, N. Gokce, R. Shibata, Y. Akasaki, A. Shimono, and K. Walsh. 2010. Sfrp5 is an anti-inflammatory adipokine that modulates metabolic dysfunction in obesity. *Science* 329: 454–457.
- Staal, F. J., and T. C. Luis. 2010. Wnt signaling in hematopoiesis: crucial factors for self-renewal, proliferation, and cell fate decisions. *J. Cell. Biochem.* 109: 844–849.
- Wend, P., J. D. Holland, U. Ziebold, and W. Birchmeier. 2010. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21: 855–863.
- Brack, A. S., M. J. Conboy, S. Roy, M. Lee, C. J. Kuo, C. Keller, and T. A. Rando. 2007. Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science* 317: 807–810.
- Liu, H., M. M. Fergusson, R. M. Castilho, J. Liu, L. Cao, J. Chen, D. Malide, I. I. Rovira, D. Schimel, C. J. Kuo, et al. 2007. Augmented Wnt signaling in a mammalian model of accelerated aging. *Science* 317: 803–806.
- Pereira, C., D. J. Schaefer, E. B. Bachli, M. O. Kurrer, and G. Schoedon. 2008. Wnt5A/CaMKII signaling contributes to the inflammatory response of macrophages and is a target for the antiinflammatory action of activated protein C and interleukin-10. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28: 504–510.
- Rao, T. P., and M. Kühl. 2010. An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ. Res.* 106: 1798–1806.
- Gao, C., and Y. G. Chen. 2010. Dishevelled: The hub of Wnt signaling. *Cell. Signal.* 22: 717–727.
- Wu, D., and W. Pan. 2010. GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem. Sci.* 35: 161–168.
- Beurel, E., S. M. Michalek, and R. S. Jope. 2010. Innate and adaptive immune responses regulated by glycogen synthase kinase-3 (GSK3). *Trends Immunol.* 31: 24–31.
- Beurel, E., W. I. Yeh, S. M. Michalek, L. E. Harrington, and R. S. Jope. 2011. Glycogen synthase kinase-3 is an early determinant in the differentiation of pathogenic Th17 cells. *J. Immunol.* 186: 1391–1398.
- Wu, B., S. P. Crompton, and C. C. Hughes. 2007. Wnt signaling induces matrix metalloproteinase expression and regulates T cell transmigration. *Immunity* 26: 227–239.
- Neumann, J., K. Schaale, K. Farhat, T. Endermann, A. J. Ulmer, S. Ehlers, and N. Reiling. 2010. Frizzled1 is a marker of inflammatory macrophages, and its

- ligand Wnt3a is involved in reprogramming Mycobacterium tuberculosis-infected macrophages. *FASEB J.* 24: 4599–4612.
22. Blumenthal, A., S. Ehlers, J. Lauber, J. Buer, C. Lange, T. Goldmann, H. Heine, E. Brandt, and N. Reiling. 2006. The Wingless homolog WNT5A and its receptor Frizzled-5 regulate inflammatory responses of human mononuclear cells induced by microbial stimulation. *Blood* 108: 965–973.
23. Kim, J., J. Kim, D. W. Kim, Y. Ha, M. H. Ihm, H. Kim, K. Song, and I. Lee. 2010. Wnt5a induces endothelial inflammation via beta-catenin-independent signaling. *J. Immunol.* 185: 1274–1282.
24. Sen, M. 2005. Wnt signalling in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 44: 708–713.
25. Rodionova, E., M. Conzelmann, E. Maraskovsky, M. Hess, M. Kirsch, T. Giese, A. D. Ho, M. Zöller, P. Dreger, and T. Luft. 2007. GSK-3 mediates differentiation and activation of proinflammatory dendritic cells. *Blood* 109: 1584–1592.
26. Martínez, V. G., C. Hernández-López, J. Valencia, L. Hidalgo, A. Entrena, A. G. Zapata, A. Vicente, R. Sacedón, and A. Varas. 2011. The canonical BMP signaling pathway is involved in human monocyte-derived dendritic cell maturation. *Immunol. Cell Biol.* 89: 610–618.
27. Valencia, J., C. Hernández-López, V. G. Martínez, L. Hidalgo, A. G. Zapata, A. Vicente, A. Varas, and R. Sacedón. 2010. Transient beta-catenin stabilization modifies lineage output from human thymic CD34+CD1a- progenitors. *J. Leukoc. Biol.* 87: 405–414.
28. Liu, J., S. Cao, S. Kim, E. Y. Chung, Y. Homma, X. Guan, V. Jimenez, and X. Ma. 2005. Interleukin-12: an update on its immunological activities, signaling and regulation of gene expression. *Curr. Immunol. Rev.* 1: 119–137.
29. Chomarat, P., J. Banchereau, J. Davoust, and A. K. Palucka. 2000. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat. Immunol.* 1: 510–514.
30. Chomarat, P., C. Dantin, L. Bennett, J. Banchereau, and A. K. Palucka. 2003. TNF skews monocyte differentiation from macrophages to dendritic cells. *J. Immunol.* 171: 2262–2269.
31. Kühl, M., L. C. Sheldahl, M. Park, J. R. Miller, and R. T. Moon. 2000. The Wnt/Ca2+ pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet.* 16: 279–283.
32. Bradley, E. W., and M. H. Drissi. 2010. WNT5A regulates chondrocyte differentiation through differential use of the CaN/NFAT and IKK/NF-kappaB pathways. *Mol. Endocrinol.* 24: 1581–1593.
33. Spencer, G. J., J. C. Utting, S. L. Etheridge, T. R. Arnett, and P. G. Genever. 2006. Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NF-kappaB ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. *J. Cell Sci.* 119: 1283–1296.
34. Tickenbrock, L., J. Schwäble, A. Strey, B. Sargin, S. Hehn, M. Baas, C. Choudhary, V. Gerke, W. E. Berdel, C. Müller-Tidow, and H. Serve. 2006. Wnt signaling regulates transendothelial migration of monocytes. *J. Leukoc. Biol.* 79: 1306–1313.
35. Thiele, A., M. Wasner, C. Müller, K. Engeland, and S. Hauschildt. 2001. Regulation and possible function of beta-catenin in human monocytes. *J. Immunol.* 167: 6786–6793.
36. Topol, L., X. Jiang, H. Choi, L. Garrett-Beal, P. J. Carolan, and Y. Yang. 2003. Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent beta-catenin degradation. *J. Cell Biol.* 162: 899–908.
37. Nemeth, M. J., L. Topol, S. M. Anderson, Y. Yang, and D. M. Bodine. 2007. Wnt5a inhibits canonical Wnt signaling in hematopoietic stem cells and enhances repopulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 15436–15441.
38. Liu, X., M. Yao, N. Li, C. Wang, Y. Zheng, and X. Cao. 2008. CaMKII promotes TLR-triggered proinflammatory cytokine and type I interferon production by directly binding and activating TAK1 and IRF3 in macrophages. *Blood* 112: 4961–4970.
39. Kawai, T., and S. Akira. 2007. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol. Med.* 13: 460–469.
40. Bartz, H., N. M. Avalos, A. Baetz, K. Heeg, and A. H. Dalpke. 2006. Involvement of suppressors of cytokine signaling in toll-like receptor-mediated block of dendritic cell differentiation. *Blood* 108: 4102–4108.
41. Wölflle, S. J., J. Strebovsky, H. Bartz, A. Sähr, C. Arnold, C. Kaiser, A. H. Dalpke, and K. Heeg. 2011. PD-L1 expression on tolerogenic APCs is controlled by STAT-3. *Eur. J. Immunol.* 41: 413–424.
42. Torres-Aguilar, H., S. R. Aguilar-Ruiz, G. González-Pérez, R. Munguía, S. Bajaña, M. A. Meraz-Ríos, and C. Sánchez-Torres. 2010. Tolerogenic dendritic cells generated with different immunosuppressive cytokines induce antigen-specific anergy and regulatory properties in memory CD4+ T cells. *J. Immunol.* 184: 1765–1775.
43. Chamorro, S., J. J. García-Vallejo, W. W. Unger, R. J. Fernandes, S. C. Bruijns, S. Laban, B. O. Roep, B. A. 't Hart, and Y. van Kooyk. 2009. TLR triggering on tolerogenic dendritic cells results in TLR2 up-regulation and a reduced proinflammatory immune program. *J. Immunol.* 183: 2984–2994.
44. Dimitriou, I. D., L. Clemenza, A. J. Scotter, G. Chen, F. M. Guerra, and R. Rottapel. 2008. Putting out the fire: coordinated suppression of the innate and adaptive immune systems by SOCS1 and SOCS3 proteins. *Immunol. Rev.* 224: 265–283.
45. Li, Y., N. Chu, A. Rostami, and G. X. Zhang. 2006. Dendritic cells transduced with SOCS-3 exhibit a tolerogenic/DC2 phenotype that directs type 2 Th cell differentiation in vitro and in vivo. *J. Immunol.* 177: 1679–1688.
46. Kuo, P. L., J. Y. Hung, S. K. Huang, S. H. Chou, D. E. Cheng, Y. J. Jong, C. H. Hung, C. J. Yang, Y. M. Tsai, Y. L. Hsu, and M. S. Huang. 2011. Lung cancer-derived galectin-1 mediates dendritic cell anergy through inhibitor of DNA binding 3/IL-10 signaling pathway. *J. Immunol.* 186: 1521–1530.
47. Gratchev, A., J. Kzhyshkowska, S. Kannokadan, M. Ochsenreiter, A. Popova, X. Yu, S. Mamidi, E. Stonehouse-Usselman, I. Muller-Molinet, L. Gooi, and S. Goerdt. 2008. Activation of a TGF-beta-specific multistep gene expression program in mature macrophages requires glucocorticoid-mediated surface expression of TGF-beta receptor II. *J. Immunol.* 180: 6553–6565.
48. Pastille, E., S. Didovic, D. Brauckmann, M. Rani, H. Agrawal, F. U. Schade, Y. Zhang, and S. B. Flohé. 2011. Modulation of dendritic cell differentiation in the bone marrow mediates sustained immunosuppression after polymicrobial sepsis. *J. Immunol.* 186: 977–986.
49. Domínguez, P. M., and C. Ardavin. 2010. Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation. *Immunol. Rev.* 234: 90–104.
50. Cheong, C., I. Matos, J. H. Choi, D. B. Dandamudi, E. Shrestha, M. P. Longhi, K. L. Jeffrey, R. M. Anthony, C. Kluger, G. Nchinda, et al. 2010. Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* 143: 416–429.

The CXCL12/CXCR4 Pair in Aged Human Thymus

Carmen Hernández-López^a Alberto Varas^b Rosa Sacedón^b Víctor G. Martínez^b
Laura Hidalgo^b Jaris Valencia^b Agustín G. Zapata^c Ángeles Vicente^b

^aCenter for Cytometry and Microscopy, ^bDepartment of Cell Biology, School of Medicine, and ^cFaculty of Biology, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

Key Words

Chemokines · CXCL12/CXCR4 · Human thymus · Aging · T cell maturation

Abstract

CXCL12 is an important CXC chemokine involved in numerous biological processes. We had previously demonstrated the synergistic participation of CXCL12 and IL-7 in the control of both survival and proliferation of CD34⁺ human thymic lymphoid progenitors. On this basis, we hypothesize a presumptive role for CXCL12 and its receptor, CXCR4, in the thymus involution. In this respect, in the current report we describe the expression of both molecules in the human thymus during aging. Our results demonstrate that, despite the profound alterations observed in the thymic epithelial microenvironment of aged thymuses, the proportions of different CD4/CD8 thymocyte subsets do not undergo significant variations. Remarkably, a strong CXCL12 expression was found in older thymuses, which appeared in the same locations as in younger thymuses: the subcapsulary and medullary areas. The proportions of CXCR4⁺ cells, most of them belonging to the CD3⁺ compartment, showed no important variations in the older thymuses. However, within the CD34⁺ cell population, a significant reduction in the expression of CXCR4 molecules was observed.

Copyright © 2010 S. Karger AG, Basel

Introduction

Chemokines are small, soluble proteins (about 10 kDa) capable to produce a chemotactic cellular response. The chemokine family, which approximately comprises 50 members and 25 receptors, has been divided into four groups based on the position of the four conserved cysteine residues in the N-terminal region. With a few exceptions, CC chemokines bind to CC receptors, whereas CXC chemokines activate CXC receptors. Chemokine receptors belong to the family of G-protein-coupled receptors that activate adenylate-cyclase, phospholipases, GTPases (Rho, Rac, Cdc42) and major kinases (MAPK, PI3K) [1].

CXCL12 is an important member of the CXC subfamily that was firstly isolated from a murine bone marrow stroma cell line and has pleiotropic effects on the lympho-hematopoietic system as well as on the nervous system. CXCL12 was initially reported as a highly effective chemoattractant for lymphocytes and monocytes but not for neutrophils. Later it was recognized for regulating mature T and B lymphocyte survival and the generation of memory T cells [2]. In addition, CXCL12 and its receptor CXCR4 are key factors to regulate homing/mobilization of hematopoietic stem cells between bone marrow and peripheral blood, a process that undergoes catecholamine-mediated circadian variations [3]. On the

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2010 S. Karger AG, Basel
1021–7401/10/0173–0217\$26.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/nim

Carmen Hernández-López
Center for Cytometry and Microscopy
Complutense University of Madrid
ES-28040 Madrid (Spain)
Tel. +34 913 944 938, Fax +34 913 944 191, E-Mail carmenh@bio.ucm.es

other hand, CXCL12 and CXCR4 are constitutively expressed in the central nervous system and modulate neurotransmission, neurotoxicity and neuroglial interactions [1].

The involvement of CXCL12/CXCR4 in T cell differentiation is controversial. Although studies on CXCL12/CXCR4 gene disrupted mice suggested that these molecules are not required for the generation of a normal murine T cell population, other studies pointed out a role for CXCL12 in T cell differentiation. Several years ago, we demonstrated that CXCL12/CXCR4 signaling is not critical for the CD34⁺ precursor cell recruitment to the human thymus but CXCL12 participates in the control of human lymphoid precursor cell survival and proliferation [4]. In this process, CXCL12 acts synergistically with IL-7, but not with other cytokines such as SCF (stem cell factor) or Flt3L (FMS-like tyrosine kinase 3 ligand), known to be important for the biology of lymphoid progenitors. IL-7 upregulates the CXCR4 expression on CD34⁺ human lymphoid progenitors and, at the same time, stimulates the CXCL12 production by thymic epithelial cells (TEC). In turn, CXCL12 downregulates the IL-7 production by TEC.

The capacity of CXCL12 for controlling survival of thymic cells is not restricted to the thymocyte lineage. We recently demonstrated that human thymic dendritic cells (DC) express CXCR4 and produce CXCL12 that increases the survival and allostimulatory capacities of DC [5].

Based on these previous results, we hypothesize that since CXCL12 affects viability and proliferation of CD34⁺ progenitor cells and their effects are related with IL-7/IL-7R signaling reported to be involved in thymus involution, this chemokine could be important to recover the thymus from physiological or experimentally induced conditions that course with decreased thymocyte production. Therefore, the current results are devoted to the analysis of CXCL12/CXCR4 condition in the involuted thymus that occurs during human aging.

Morphological Changes in the Human Thymus during Aging

The first signs of histological involution were clearly evidenced in 15- to 20-year-old human thymuses, markedly increasing in 30- to 40-year-old samples. Thymic involution coursed with disappearance of a clear cortex-medulla demarcation, principally due to extreme reduction of the cortical area that, in some older samples, ap-

peared reduced to small groups of CD1⁺ cells. Accordingly, the medullary area was proportionally increased but also appeared importantly altered. Other authors have described similar features in the involuted thymuses during aging, including significant reduction of the thymic surface area, decline of MHC class II and keratin expression and increased presence on certain molecules, such as Notch1 and Delta [6]. The condition of thymic medulla during aging is controversial. Some authors have described fewer changes in the medulla than in the thymic cortex of aged thymuses, but others suggest a parallel decline of both thymic compartments [6]. Retraction of epithelial cell processes in all thymic compartments also occurred in the older thymuses, a feature that has been related with the appearance of epithelial-free areas in the involuted thymuses [6].

Slight Changes in the Proportions of CD4/CD8 Thymocyte Subsets Occur in Aged Human Thymus

Despite the described profound alterations occurring in the thymic epithelial microenvironment of aged thymus, no significant variations were observed in the proportions of the different thymocyte subsets defined by the expression of CD4/CD8 markers. Analysis of human samples from postnatal to 70-year-old thymuses showed just a slight increase in the older ones in the proportions of DN and SP (both CD4⁺CD8⁻ and CD4⁻CD8⁺) cells. Correspondingly, decreased proportions of DP thymocytes occurred in those older thymuses that could be related with an increased percentage of apoptotic DP cells described in those thymuses [7].

CXCL12 Production in Older Human Thymuses

CXCL12 was expressed in the older thymuses in the same locations than in the younger ones [4]. By using specific markers for cortical and medullary TEC in combination with antibodies against CXCL12 we observed that CXCL12 expression occurred in the subcapsulary cortical area and in both the TE-4⁺ TEC and Hassall's bodies of thymic medulla (fig. 1a). It is important to remark that, since thymus size decreases during aging, the relative area occupied by CXCL12⁺ cells is presumably larger in older thymuses than in younger ones.

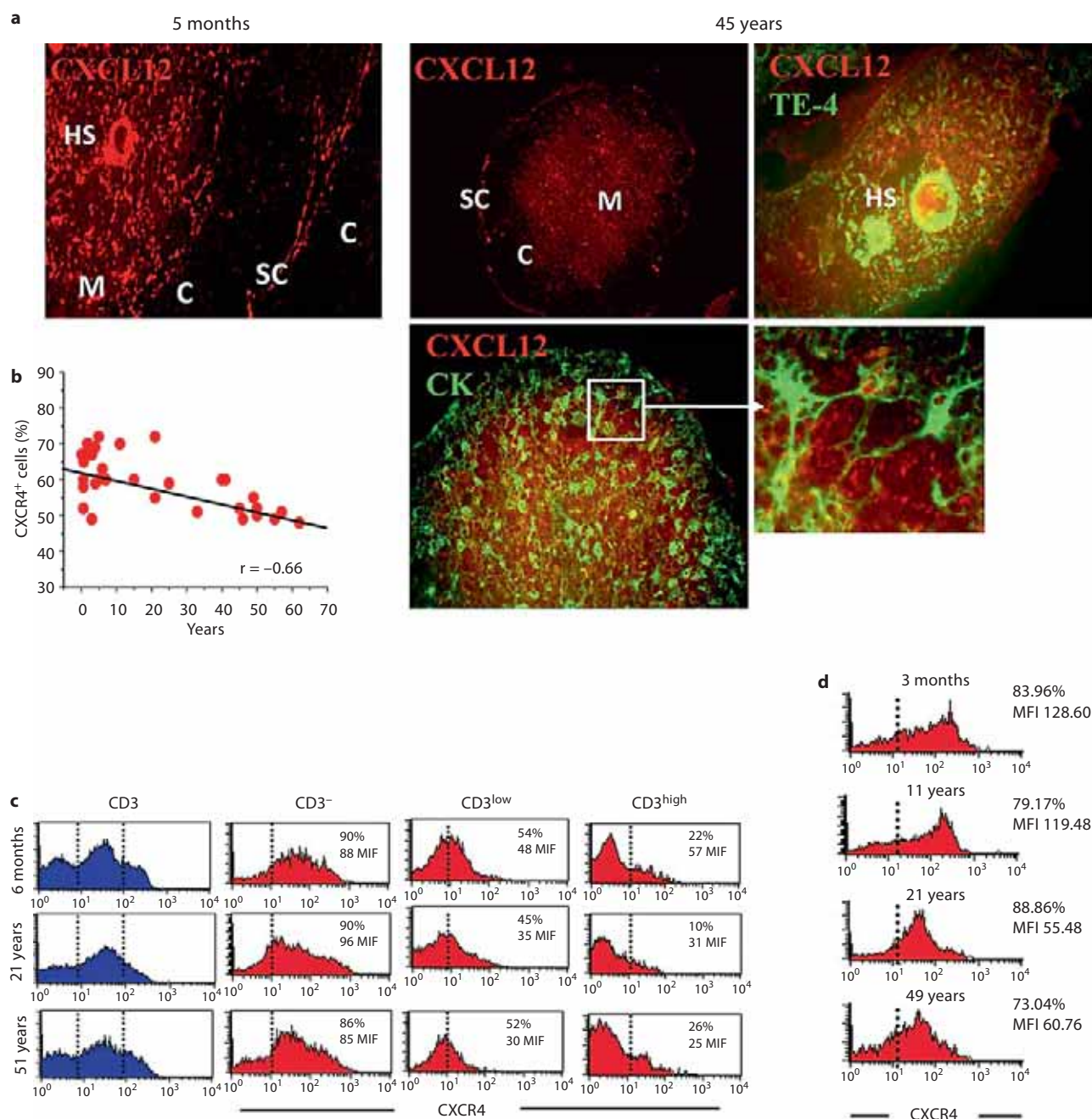


Fig. 1. Expression of CXCL12 and CXCR4 in the aged human thymus. **a** Immunohistochemical detection of CXCL12 in the subcapsule (SC) and medulla (M). Note the association of CXCL12 staining with keratin (CK)-positive TEC. HS = Hassall's bodies; C = thymic cortex. **b** Proportions of total thymic CXCR4⁺ cells in human thymuses of different ages. **c** CXCR4 expression in thymocyte subsets defined by CD3 expression. **d** Decreased numbers of CXCR4 on the surface of CD34⁺ thymic cells during aging. MFI = Mean fluorescence intensity.

No significant variations were observed in the proportions of thymic CXCR4⁺ cells in older thymuses. The percentage of CXCR4⁺ cells in older thymuses was in the range described in the younger ones, although their values were in the lower level of such range in samples from individuals older than 20 years (fig. 1b).

As previously demonstrated [4] in young thymuses, most CD3⁺ thymocytes expressed CXCR4 (around 90%) and the proportion of CXCR4⁺ cells gradually decreased in CD3^{low} thymocytes that largely included the DP cells (around 50%) and CD3^{hi} SP and DP thymocytes (around 20%). However, in each of these cell subpopulations the proportion of CXCR4⁺ cells remained basically unaltered when younger and older samples were comparatively evaluated (fig. 1c). Thus, the percentage of CXCR4-expressing CD34⁺ cells did not change throughout the life, but from the second decade of life onward, there was a significant reduction in the mean fluorescence intensity (MFI) of CXCR4 molecule (fig. 1d). On the contrary, the CD127 (IL-7 receptor α chain) expression on CD34⁺ thymocytes did not change during aging (data not shown), although a reduced production of IL-7 with age has been reported [8].

These results demonstrate no important alterations in the expression of both CXCL12 and CXCR4 in the human thymus during aging, suggesting that as in younger thymuses, these molecules could play a role in the control of thymus homeostasis during aging. On the other hand, the lower numbers of receptors expressed by CD34⁺ lymphoid progenitors in older respect to younger thymuses together with the difficulties to establish direct correlations between the expression of CXCL12/CXCR4 and that of the IL-7/IL-7R pair, as reported in younger thymuses [4] could explain partially the low numbers known to occur in the aged thymuses, although they maintain unchanged proportions of CD4/CD8 thymocyte subsets. More functional studies are necessary, however, to confirm whether CXCL12 is involved also in aged thymuses in the control of the survival of CD34⁺ lymphoid progenitors and other thymocyte subsets, as observed in younger ones.

References

- 1 Li M, Ransohoff RM: Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: a migration from immunology to neurobiology. *Prog Neurobiol* 2008;84:116–131.
- 2 Klein RS, Rubin JB: Immune and nervous system CXCL12 and CXCR4: parallel roles in patterning and plasticity. *Trends Immunol* 2004;25:306–314.
- 3 Lucas D, Battista M, Shi PA, Isola L, Frenette PS: Mobilized hematopoietic stem cell yield depends on species-specific circadian timing. *Cell Stem Cell* 2008;3:364–366.
- 4 Hernandez-Lopez C, Varas A, Sacedon R, Jimenez E, Munoz JJ, Zapata AG, Vicente A: Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for early human T-cell development. *Blood* 2002;99:546–554.
- 5 Hernandez-Lopez C, Valencia J, Hidalgo L, Martinez VG, Zapata AG, Sacedon R, Varas A, Vicente A: CXCL12/CXCR4 signaling promotes human thymic dendritic cell survival regulating the Bcl-2/Bax ratio. *Immunol Lett* 2008;120:72–78.
- 6 Aw D, Taylor-Brown F, Cooper K, Palmer DB: Phenotypical and morphological changes in the thymic microenvironment from ageing mice. *Biogerontology* 2009;10:311–322.
- 7 Gui J, Zhu X, Dohkan J, Cheng L, Barnes PF, Su DM: The aged thymus shows normal recruitment of lymphohematopoietic progenitors but has defects in thymic epithelial cells. *Int Immunol* 2007;19:1201–1211.
- 8 Aspinall R, Andrew D: Thymic atrophy in the mouse is a soluble problem of the thymic environment. *Vaccine* 2000;18:1629–1637.

Transient β -catenin stabilization modifies lineage output from human thymic CD34⁺CD1a⁻ progenitors

Jaris Valencia,* Carmen Hernández-López,* Víctor G. Martínez,* Laura Hidalgo,* Agustín G. Zapata,[†] Ángeles Vicente,* Alberto Varas,*¹ and Rosa Sacedón*^{1,2}

Department of Cell Biology, Faculties of *Medicine and [†]Biology, Complutense University, Madrid, Spain

RECEIVED MAY 22, 2009; REVISED OCTOBER 8, 2009; ACCEPTED OCTOBER 28, 2009. DOI: 10.1189/jlb.0509344

ABSTRACT

Increasing evidence includes Wnt proteins inside the group of master-signaling pathways that govern immune and nonimmune differentiation systems, fundamental for normal development and homeostasis. Although their precise functions in bone marrow and thymus are still controversial, numerous studies have shown that Wnt signaling is able to control the proliferation of hematopoietic stem cells and thymic progenitors and might also affect their cell-fate decisions and subsequent maturation. In the present work, we analyze the effect of transient stimulation of the canonical Wnt pathway in the differentiation potential of Lin⁻CD34⁺CD1a⁻ human thymic progenitors, a multipotent and heterogeneous cell population that has the capacity to develop into T cells, NK cells, monocytes, cDC, and pDC. Our results demonstrate that giving a boost to canonical Wnt signaling, triggered by transient exposure to Wnt3a or LiCl, the differentiation capacity of thymic progenitors changes, enhancing NK cell production. On the contrary, Wnt3a- or LiCl-pretreated thymic progenitors generate a significantly lower number of myeloid lineage cells, monocytes, and cDC and exhibit a reduced capacity to differentiate into pDC lineage. As a possible mechanism for this effect, we show that Wnt3a- and LiCl-pretreated progenitors change their membrane levels of receptors for cytokines pivotal for their expansion and differentiation, such as Flt3L. Moreover, canonical Wnt pathway stimulation modifies the transcription factor profile of CD34⁺CD1⁻ thymocytes, increasing Hes-1 and ID3 expression levels. *J. Leukoc. Biol.* 87: 405–414; 2010.

Abbreviations: cDC=conventional dendritic cell(s), Dkk1=Dickkopf homolog 1 (*Xenopus laevis*), DN=double-negative, DP=double-positive, Flt3L=fetal liver tyrosine kinase 3 ligand, FTOC=fetal thymic organ culture(s), Fzd=Frizzled, GNB2L1=guanine nucleotide-binding protein (G protein), β -polypeptide 2-like 1, GSK-3 β =glycogen synthase kinase-3 β , Hes-1=homeobox gene in embryonic stem cell 1, HSC=hematopoietic stem cell(s), ID2/3=inhibitor of DNA binding 2/3, LEF=lymphoid enhancer factor, LiCl=lithium chloride, LPR=lipoprotein-related protein, pDC=plasmacytoid dendritic cell(s), PI=propidium iodide, SCF=stem cell factor, TCF=T cell factor

Introduction

As reported for other families of morphogens described in the thymus [1], besides being key in the bone marrow, Wnt proteins direct fundamental events during development and tissue renewal, proving the existence of common, basic rules that govern differentiation systems in the embryo and adult organism [2–5]. Wnt signaling pathway is part of the intricate signaling network involved in directing expansion and differentiation of cell progenitors in the thymus [6].

Wnt proteins bind to Fzd receptors that interact with a coreceptor, LPR5 or LPR6 [3]. The Wnt-Fzd-LPR multiprotein complex initiates three possible downstream signaling pathways that can exhibit antagonistic interactions: the canonical Wnt/ β -catenin pathway and two noncanonical Wnt pathways such as Wnt/ Ca^{2+} and RhoA/c-JNK signaling cascades. Wnt signaling output depends on the initial Wnt receptor complex formed, intermediate signaling components, and target cell [7]. The canonical Wnt pathway leads to activation of Dishevelled-1 proteins, which withhold the GSK-3 β activity. In the absence of GSK-3 β activity, β -catenin is not phosphorylated, and therefore, its ubiquitination and subsequent proteasome degradation are impeded. As β -catenin is synthesized continuously, stabilized β -catenin accumulates in the cytosol and translocates to the nucleus, where it interacts with and coactivates members of the LEF/TCF transcription factor family, leading to the activation of target gene expression [5]. Indeed, these transcription factors act as repressors until they are turned on by β -catenin.

Different experimental approaches have been attempted to elucidate the role of canonical Wnt signaling during T cell differentiation. However, results obtained after deletion of β -catenin and/or γ -catenin in HSC, showing that there are no alterations in thymic populations [8–10], are in conflict with the profound changes observed in hematopoiesis and T cell development after constitutive β -catenin stabilization in HSC [8–12] or CD4⁻CD8⁻ DN thymocytes [13, 14]. The analysis of TCF-1 and Lef-1 knock-

1. These authors contributed equally to this work.

2. Correspondence: Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Avenida Complutense s/n, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain. E-mail: rosasacedon@med.ucm.es

out mice clearly demonstrated that canonical Wnt transcription factors are crucial for T cell maintenance and differentiation [15–19]. Hence, in thymocytes, TCF-1/Lef interaction with β -catenin turns their function from repressors to transcriptional activators, and the β -catenin–TCF complex promotes, in part, the transcription of certain T lymphocyte-specific genes [20]. In this sense, during T cell differentiation, pre-TCR signaling induces TCF expression, and therefore, Wnt and pre-TCR pathways cooperate to ensure (CD44⁺CD25⁺) DN3 (CD44⁺CD25⁺) and DN4 cell survival [17]. Accordingly, strategies that lead to attenuation of Wnt signaling impair thymic function in mice. In FTOC, the overexpression of the secreted Wnt inhibitor Dkk1 [21] or soluble Fzd receptors [19] blockades T cell differentiation at the DN stage. A similar result is obtained, increasing the levels of the inhibitor of β -catenin–TCF interaction [22]. On the other hand, Wnt-1/Wnt-4 double-deficiency triggers a reduction of thymic cellularity without affecting the proportions of thymocyte subsets, possibly because of the existence of certain redundancy among Wnt proteins [23]. Canonical Wnt signaling also regulates survival [18, 24, 25], maturation [14], and selection of CD4⁺CD8⁺ DP cells in the thymus [26, 27].

Human thymic CD34⁺ cell progenitors express Fzd receptors and LPR5/6 coreceptors and represent the thymocyte subset with the highest levels of total and active (no phosphorylated) β -catenin [21]. Analysis by DNA microarrays of Wnt target genes in the CD34⁺ thymic cell subset indicates that activation of the canonical Wnt pathway regulates the expression of genes involved in cell adhesion, proliferation, and cell survival [28]. However, until our knowledge, no study has analyzed the possible implication of Wnt signaling during early differentiation events of thymic CD34⁺ cell progenitors. This population can be subdivided according to CD1a expression; most immature thymocytes are included in the Lin⁺CD34⁺CD1a⁺ cell subset, and CD1a expression correlates with T cell commitment. The next differentiation stage lacks CD34 antigen, expresses the CD4 marker (CD4^{imm}), and proceeds to the DP thymocyte population, which suffers selection processes and differentiates into CD4 or CD8 T cells [29].

The thymic microenvironment largely promotes stem cell differentiation into T cell lineage, providing adequate Notch ligands and soluble signals to hematopoietic progenitors that colonize the thymus [1, 30]. Nevertheless, it is important to note that most immature thymic progenitors (CD34⁺CD1a⁺ subset) include multipotent cells, which in addition to developing into T cells, have the capacity to differentiate in the thymus toward NK cells, monocytes, and cDC or pDC [31, 32]. The current work was undertaken to address the possible influence of Wnt signaling in thymic lineage output. We demonstrated that a pulse of canonical Wnt signaling modifies the differentiation capacity of CD34⁺CD1a⁺ thymic progenitors, mainly promoting NK lineage differentiation, while reducing monocyte, cDC, and pDC production. Modifications in cytokine receptor expression levels in thymic progenitors and the expression profile of transcription factors could account for these effects.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of human thymic CD34⁺CD1a⁺ cells

Human thymus samples from patients aged 1 month to 3 years undergoing corrective cardiac surgery were obtained and used according to the guide-

lines of the Medical Ethics Commission of Madrid-Montepíncipe and 12 de Octubre Hospitals (Madrid, Spain). Informed consent was provided according to the Declaration of Helsinki. Thymuses were dissected free of the surrounding connective tissue and then disrupted gently with a Potter homogenizer until disaggregated completely. Thymic cell suspensions were first enriched in immature thymocytes by using the sheep RBC rosetting technique, and the recovered cells were then depleted of T, B, NK, myeloid, and DC by treatment with saturating concentrations of anti-CD3 (HIT3a), anti-CD4 (RPA-T4), anti-CD19 (HIB19), anti-CD56 (B159), anti-CD11c (B-ly6), anti-CD14 (M5E2), and anti-CD13 (WM15; all from BD Biosciences, San Jose, CA, USA) bound to sheep anti-mouse Ig-coated magnetic beads (Dynabeads, Dynal, Oslo, Norway) as described previously [33]. This CD34⁺ cell suspension, whose purity was >95%, was next depleted of CD1a-positive cells following a similar procedure but now using anti-CD1a antibodies. The purity of the recovered Lin⁺CD34⁺CD1a⁺ cells was >95%.

Flow cytometry

The following mAb conjugated with FITC, PE, Cychrome, and APC were used for flow cytometric analysis: CD1a (HI149), CD4 (SK3), CD8a (SK1), CD11c (B-ly6), CD14 (M5E2), CD34 (8G12), CD45RA (HI100), CD56 (B159), CD117 (YB5.B8), CD123 (7G3, 9F5), CD127 (R34.34), and HLA-DR (G46.6; all from BD Biosciences); CD13 (TüK1) and CD135 (BV10A4H2; Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA); CD122 (MIK- β 1; ImmunoTools, Friesoythe, Germany); CD314/NKG2D (1D11) and CD94 (DX22; BioLegend, San Diego, CA, USA); and CD303/BDCA-2 (AC144; Miltenyi Biotec, Bergisch, Gladbach, Germany). For the intracellular staining of total β -catenin in freshly isolated thymocyte subpopulations, cells were counterstained to distinguish different subsets, fixed, and permeabilized using Cytotfix/Cytoperm solution, washed with Perm/Wash buffer (BD Biosciences), and stained with FITC-conjugated anti- β -catenin mAb (14, BD Biosciences). For the intracellular staining of phosphorylated STAT5, cells were treated with Cell Fix and Perm Buffer III (BD Biosciences) and stained with Alexa Fluor 488-conjugated anti-human phospho-STAT5 (Tyr⁶⁹⁴) (BD Biosciences). Analyses were conducted in a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) from the Centro de Microscopía y Citometría (Complutense University, Madrid, Spain).

Transient stabilization of β -catenin

Purified thymic Lin⁺CD34⁺CD1a⁺ precursors were treated with murine recombinant Wnt3a at a concentration of 100 ng/ml (Chemicon International, Temecula, CA, USA) or with 10 mM LiCl (Sigma, Spain) for 12 h in Yssel's medium supplemented with 5% FCS (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, NY, USA), 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin (Sigma, Spain). Control CD34⁺CD1a⁺ human thymic progenitors were cultured in parallel in the absence of treatment. For the intracellular staining of active β -catenin and according to the manufacturer's instructions, cells were treated with Cell Fix and Perm Buffer III (BD Biosciences) to avoid the action of phosphatases, which could increase the level of nonphosphorylated β -catenin unspecifically. Then, cells were stained with anti-human active β -catenin mAb (8E7) [11] (Millipore Ibérica, Madrid, Spain), followed by PE-conjugated donkey anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA).

Cell differentiation assays

After 12 h of pretreatment, thymic CD34⁺CD1a⁺ progenitors were washed gently prior to their use in several differentiations assays:

Chimeric human-mouse fetal thymic organ cultures. Thymic lobes derived from 15-day-old embryos of SCID mice were cocultured with 2.5×10^4 control or pretreated thymic human progenitors by the hanging drop method for 48 h, followed by culture of the recolonized lobes in FTOC for 10–11 days, as described previously [34].

Generation of NK cells in IL-15 and SCF-supported cultures of thymic precursors. Lin⁺CD34⁺CD1a⁺ cells (10^5) were cultured for 13–14 days in 100 μ l RPMI-1640 medium (Sigma, Spain) supplemented with 10% FCS, 1 mM pyruvate, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml strep-

tomycin (complete RPMI 10%) in a 96-well flat-bottom plate in the presence of the following cytokines: IL-15 (100 ng/ml; ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., Rehoboth, Israel) and SCF (100 ng/ml; Fitzgerald Industries International, Concord, MA, USA). One-third of the medium volume was changed every 5 days.

Coculture with ST2 cells. The development of CD14⁺, cDC, and pDC was assessed by coculturing 1×10^5 CD34⁺CD1a⁻ human progenitor cells with 5×10^4 ST2 cells, a stromal cell line from mouse bone marrow (provided by Dr. Maria Luisa Gaspar, Centro Nacional de Microbiología, CNM, Madrid, Spain). One day before their use in coculture experiments, ST2 cells were plated in 24-well tissue-culture plates. Culture medium consisted of complete RPMI 10%, supplemented with 5 ng/ml recombinant human IL-7 (NIBSC, Hertfordshire, UK) and 5 ng/ml recombinant human Flt3L (Fitzgerald Industries International). To determine whether the ST2-generated pDC were able to secrete IFN- α , on day 10, pDC were stimulated by adding 5 μ g/ml CpG oligodeoxynucleotide (CpG 2216; ggGGGAC-GATCGTCgggggG; Sigma-Genosys Ltd., Cambridgeshire, UK) to the cocultures for 12 h. IFN- α production was detected by intracellular staining using anti-IFN- α (LT27:295; Miltenyi Biotec) after blocking protein secretion with 5 μ g/ml Brefeldin-A (Sigma, Spain). CpG2243 (ggGGGAGCAT-GCTCgggggG; Sigma-Genosys) was used as negative control.

Apoptosis assays

The percentage of apoptotic cells was determined by staining with Annexin-V-FITC (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany), according to the supplier's instructions. Cells were analyzed on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) and gated according to forward-scatter, side-scatter, and their ability to exclude PI. Apoptotic cells were defined as Annexin-V-positive and PI-negative.

Real-time quantitative RT-PCR

RNA isolation was performed using Absolutely RNA Microprep kit (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, USA), including a DNase I digestion step, as recommended by the supplier, to avoid genomic DNA contamination. Total cDNA was synthesized by the High Capacity cDNA RT kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the supplier's instructions, and then used as target in the PCR amplifications. Real-time PCR was performed with the following TaqMan assays: Spi-B (Hs00162150_m1), Hes-1 (Hs00172878_m1), Gata-2 (Hs00231119_m1), Gata-3 (Hs00231122_m1), PU.1 (Hs00231368_m1), ETS1 (Hs00428287_m1), ID2 (Hs00747379_m1), and ID3 (Hs00171409_m1; all from Applied Biosystems). GAPDH (Predeveloped TaqMan) and GNB2L1 (Hs00272002_m1) were used as endogenous controls. All PCR reactions were set in duplicates using the TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. Amplifications, detections, and analyses were performed in a 7900HT Fast Real-Time PCR system (Centro de Genómica, Complutense University).

RESULTS

Activation of canonical Wnt signaling with Wnt3a or LiCl treatment triggers transient stabilization of β -catenin in human thymic progenitors

In the human thymus, canonical Wnt signaling occurs in all differentiation subsets, from DN thymocytes, where it is most prominent, to more mature populations [21]. Thus, according to data reported previously [21], we observed the highest levels of total β -catenin in the human thymus in the total DN CD34⁺ fraction (Fig. 1A). However, it would be reasonable to hypothesize that not all of CD34⁺CD1a⁻ progenitors must express the active form of β -catenin. To determinate the percentage of human thymic progenitors that contain this form of β -catenin, we stained freshly isolated Lin⁻CD34⁺CD1a⁻ cells with an antibody that specifically

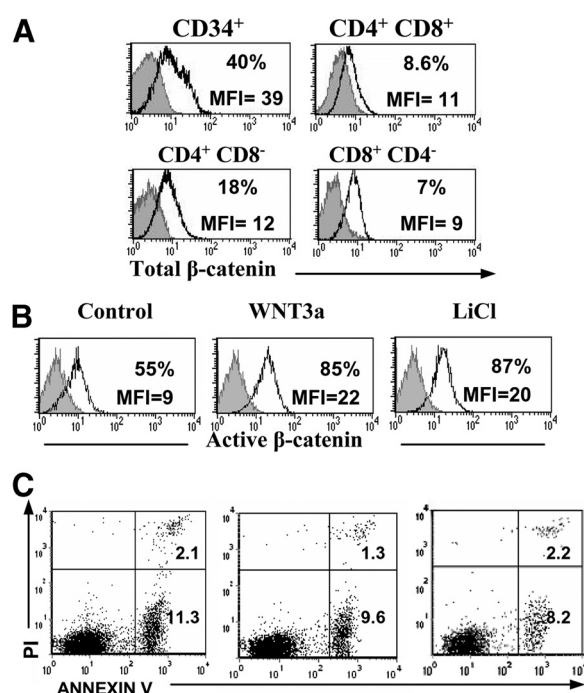


Figure 1. Wnt-3a and LiCl treatment promotes β -catenin stabilization in human thymic progenitors and increases their survival slightly. (A) Expression of total β -catenin in freshly isolated human thymic subsets defined by the surface expression of CD4, CD8, and CD34 molecules. (B) Intracellular levels of nonphosphorylated (Active) β -catenin were determined by flow cytometry in CD34⁺CD1a⁻ cells cultured for 12 h with Wnt-3a (100 ng/ml) or LiCl (10 mM) or with culture medium (Control). Data are representative of three independent experiments. Shadow histograms indicate background fluorescence. The percentage of positive cells, determined according to background staining, and the total mean fluorescence intensity (MFI) are shown in each histogram. (C) To determinate the percentage of apoptotic cells, the recovered cells were stained with Annexin-V and PI. Dot plots show the percentage of apoptotic cells (Annexin-V⁺ PI⁻). Data are representative of three independent experiments.

recognizes the nonphosphorylated form of β -catenin. Flow cytometry analysis showed that 40–60% of freshly isolated CD34⁺CD1a⁻ thymocytes expressed detectable levels of active β -catenin, suggesting that canonical Wnt signaling is regulated tightly in vivo. To give a boost to the canonical Wnt signaling pathway in thymic progenitors and exceed transiently usual signaling levels, we treated CD34⁺CD1a⁻ cells for 12 h with Wnt3a (100 ng/ml), which has been described as a prototypical agonist for the canonical pathway in the thymus, and alternatively, with LiCl (10 mM), which inhibits GSK-3 β and reduces the degradation of β -catenin by the proteasome [19]. After the cell culture, we corroborated by flow cytometry that the treatment with Wnt3a or LiCl produced a prominent increment of active β -catenin levels in most CD34⁺CD1a⁻ progenitor cells, detecting active β -catenin in 80–90% of treated cells (Fig. 1B), and cells cultured under control conditions showed similar levels of β -catenin than those found in fresh, isolated cells. We obtained similar results after 3 h of treatment (data not shown), suggesting that canonical Wnt signaling begins within the first hours of culture.

Previously reported data suggest that the Wnt signaling pathway is important for regulating cell survival of immature thymocytes [18, 24]. So, we next evaluated the effect of canonical Wnt signaling in the viability of $CD34^+CD1a^-$ progenitors, and we stained Wnt3a- or LiCl-treated cells with Annexin-V and PI. Flow cytometry analysis showed no toxic effect of Wnt3a or LiCl, as after 12 h of treatment, the percentage of PI⁺ cells did not increase. On the contrary, we observed a slight decrease in the proportion of apoptotic cells (Annexin⁺ PI⁺) in response to canonical Wnt signaling (Fig. 1C).

Differentiation of Wnt3a- and LiCl-pretreated thymic $CD34^+CD1a^-$ precursors in human-mouse chimeric FTOC

We next analyzed the possible effect of a transient stimulation of canonical Wnt- β -catenin signaling on lineage output from pretreated thymic progenitors, assaying pretreated cells in various specific differentiation systems.

We started using $CD34^+CD1a^-$ cells, pretreated with LiCl and Wnt3a, to perform human-mouse chimeric FTOC, which provide a thymic microenvironment and promote largely T cell differentiation. After 10–11 days of culture—when we compared the numbers of human cells recovered from lobes colonized with Wnt3a-pretreated cells with those obtained from control lobes—we observed a wide variability in the effects (Fig. 2A), which led to the absence of significant differences. By contrast, the numbers of recovered cells from

chimeric FTOC seeded with LiCl-pretreated progenitors were always higher than those collected from their controls. Nevertheless, there were notable variations in the magnitude of the increment found in the five experiments analyzed, and increases in the number of human cells recovered ranged from 10% to 170% (Fig. 2A).

Regarding T cell differentiation, at this time of culture, in control FTOC, approximately 25% of thymocytes had reached the DP differentiation stage, but most of the cells were within the intermediate $CD4^{imm}$ population, and approximately 15% of thymic cells remained within the most immature DN thymocyte subset. In all of the experiments analyzed, thymic lobes, colonized with Wnt3a-pretreated precursors, showed a slight reduction in the proportion of DP thymocytes (Fig. 2B). LiCl pretreatment induced an important increase in the percentage of DN cells, and concomitantly, the proportion of DP thymocytes halved with respect to control FTOC. Nonetheless, as the numbers of human cells recovered from FTOC recolonized with LiCl-pretreated precursors were increased, in absolute terms, the reduction in the DP cell population was not statistically significant. By contrast, the increment in the number of human DN thymocytes yielded after LiCl pretreatment was between 40% and 500% (data not shown).

Transient stimulation of Wnt signaling enhances differentiation of thymic $CD34^+CD1a^-$ cells to NK lineage

Chimeric human-mouse FTOC yielded a small percentage of NK cells, defined by the expression of the CD56 marker, which ranged in control cultures between 2% and 5% of total human cells, depending on the experiment. Remarkably, the percentage and the absolute number of NK cells recovered from FTOC, seeded with Wnt3a- or LiCl-pretreated cells, augmented with respect to their control counterparts in all of the experiments (Fig. 3, A and B). In the case of Wnt3a pretreatment, the increase in the percentage of NK cells relative to the control cultures varied between 45% and 65% and in cultures seeded with LiCl-pretreated progenitors, reached 120% (Fig. 3A). The absolute number of human NK cells recovered from chimeric FTOC was also higher when the thymic progenitor had been pretreated to stabilize β -catenin before seeding thymic lobes, and again, LiCl pretreatment triggered the greatest effects (Fig. 3B).

As the above results suggest that Wnt3a or LiCl pretreatment of thymic precursors might be able to enhance their differentiation into NK cells, we tried to corroborate those data, performing a differentiation assay specific to NK cell production. After 13–15 days of culture in the presence of SCF and IL-15, we collected 70–90% of $CD56^+$ cells, and supporting results found with FTOC assays, activation of canonical Wnt signaling increased the subsequent yield of NK cells from thymic progenitors (Fig. 3C). Moreover, the analysis of the expression of CD94 and NKG2D receptors in $CD56^+$ cells obtained from these cultures demonstrated a significantly higher proportion of CD94- and NKG2D-positive cells in cultures seeded after Wnt3a or LiCl pretreatment, which suggests an earlier acquisition of these receptors as a result of transient stabilization of β -catenin (Fig. 3D).

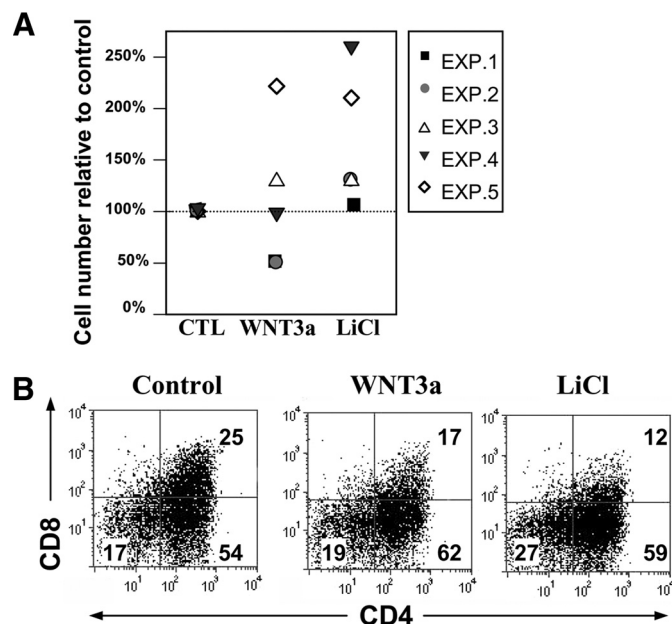


Figure 2. Stimulation of canonical Wnt signaling increases the number of $CD4^+CD8^-$ thymocytes from human-mouse chimeric FTOC. (A) The scatter plot shows the number of human cells recovered after 11 days of culture from human-mouse chimeric FTOC seeded with Wnt3a- or LiCl-pretreated progenitors, relative to those seeded with control cells (referred as 100%). The number of human cells ($CD45^+$) recovered from cultures seeded with pretreated progenitors in each experiment was divided by the number of cells recovered from its control culture to give the relative cell number of five individual experiments. (B) Dot plots show CD4 versus CD8 expression on gated human $CD45^+$ cells from 11-day cultures. Data are representative of five independent experiments.

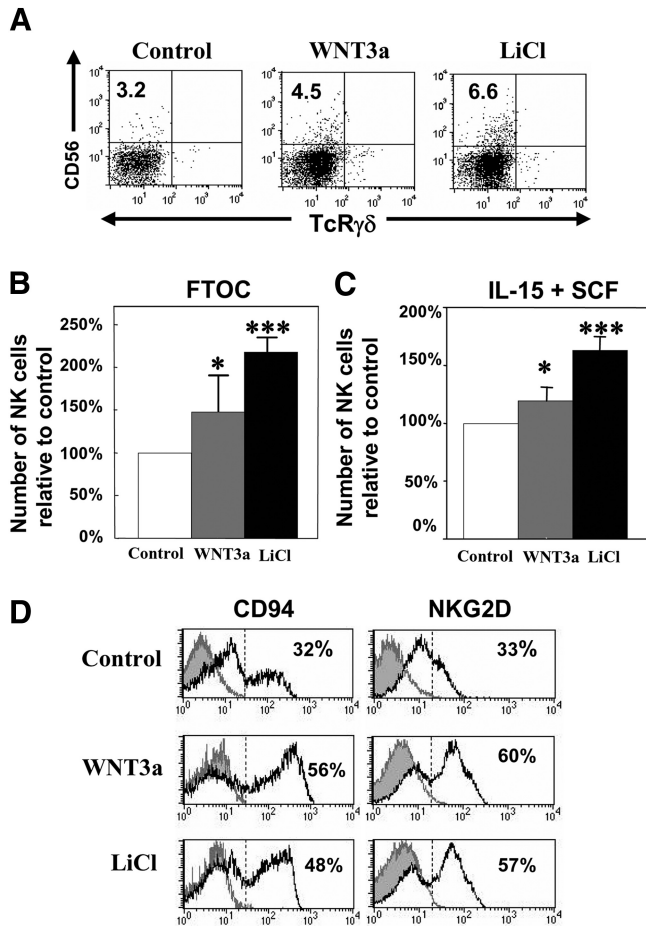


Figure 3. Transient stabilization of β -catenin enhances differentiation of thymic $CD34^+CD1a^-$ cells to NK lineage. (A) Expression of CD56 and TCR $\gamma\delta$ on $CD45^+$ human cells recovered from human-mouse chimeric FTOC cultured for 11 days. Data are representative of five independent experiments. (B and C) Numbers of human $CD56^+$ NK cells recovered from 11-day FTOC (B) or after 14 days of culture with SCF and IL-15 (C) seeded with Wnt3a- or LiCl-pretreated progenitors relative to their counterparts seeded with control cells (referred as 100%). Data represent the mean (\pm SD) of four independent experiments (*, $P \leq 0.05$; ***, $P \leq 0.001$, by *t*-test single sample). (D) Expression of CD94 and NKG2D receptors in $CD56^+$ cells yielded from control or Wnt3a/ LiCl-pretreated thymic cell progenitors after 13 days of culture with SCF and IL-15. Shadow histograms indicate background fluorescence. The percentages of positive cells, determined according to background staining, are shown in each histogram. Data are representative of three independent experiments.

The capacity of thymic progenitors to differentiate into monocytes, cDC, and pDC is reduced significantly after activation of canonical Wnt signaling

We next analyzed the impact of giving a boost to canonical Wnt signaling in the differentiation of thymic progenitors toward monocytes, cDC, and pDC. We used a modification of an *in vitro* assay described previously by Spits et al. [35], which allowed us to study the differentiation of $CD34^+CD1a^-$ cells into those three lineages. In our experiments, we cocultured pretreated human thymic progenitors with ST2 cells in the

presence of IL-7 and Flt3L cytokines during 10–11 days. Under these conditions, a population of $CD14^+$ cells, which were considered to be monocytes, was generated (Fig. 4A), and within the population of $CD14^-$ cells, we found cDC, as defined by the expression of the markers CD1a, CD11c, and HLA-DR (Fig. 4B). Cocultures of thymic progenitors and ST2 stromal cells also yielded a variable percentage of HLA-DR $^{low}CD123^{hi}CD45RA^+BDCA-2^+$ pDC (Fig. 4C), which had the ability to produce IFN- α after stimulation (Fig. 4D).

Using this experimental approach, we observed that cocultures seeded with human thymic progenitors, which had been pretreated to stabilize β -catenin, yielded a significantly reduced number of cells in comparison with their controls (Fig. 5A). It is important to note that we found this effect in all of the experiments performed with Wnt3a- or LiCl-pretreated progenitors. Remarkably, the reduction in cell number was more evident after LiCl pretreatment (percentage reduction between 30% and 50%). Regarding lineage output, both pretreatments produced a decrease in the absolute number of $CD14^+$ cells, but whereas pretreatment with Wnt3a resulted in a quite constant reduction ($\sim 40\%$), the results obtained after LiCl pretreatment were more vari-

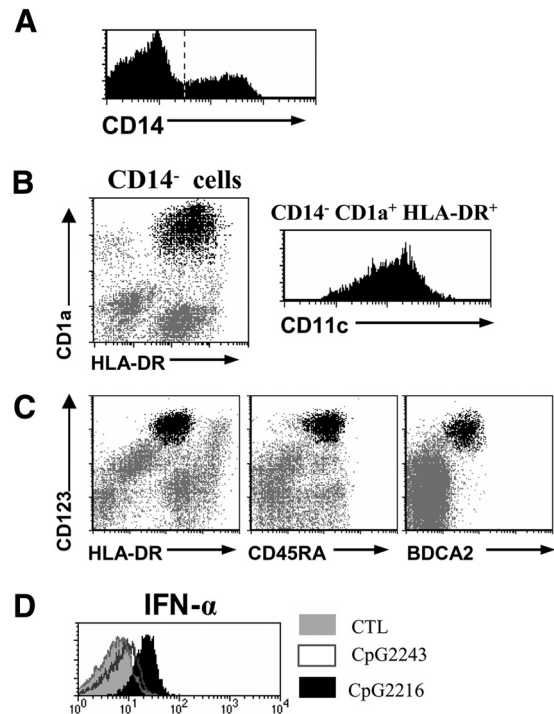


Figure 4. Phenotype of $CD14^+$, cDC, and pDC populations generated from $Lin^-CD34^+CD1a^-$ thymic progenitors cocultured with ST2 stromal cells. After 11 days of coculture, as described in Materials and Methods, the phenotype of recovered cells was analyzed by flow cytometry. (A) $CD14^+$, monocytes. (B) $CD14^-HLA-DR^+CD11c^+$, cDC. (C) $HLA-DR^{low}CD123^{hi}CD45RA^+BDCA-2^+$ pDC. Data are representative of five independent experiments. (D) After 11 days of coculture, pDC were stimulated for 12 h with CpG (2216; 5 μ g/ml; black histogram), using as negative control CpG2243 stimulation (open histogram). Flow cytometric analysis was performed after intracellular staining of IFN- α , as described in Materials and Methods. Gray histogram indicates background staining.

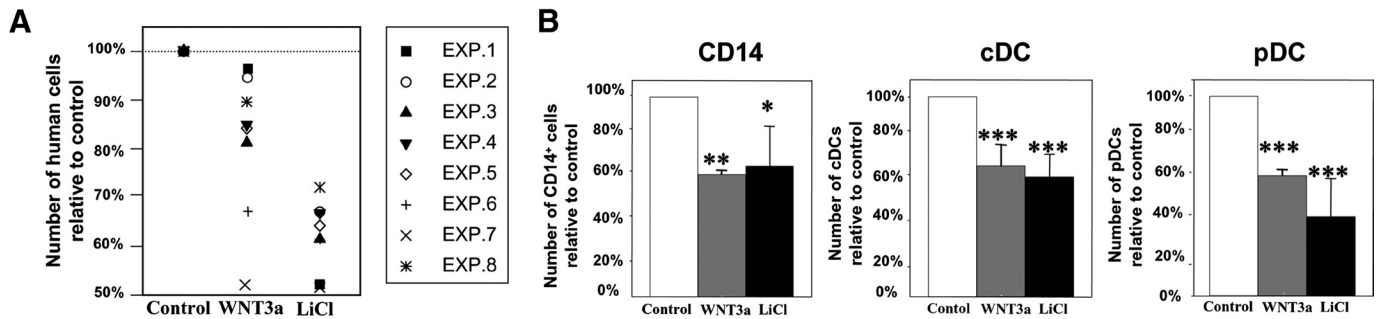


Figure 5. Reduced capacity of thymic CD34⁺CD1a⁻ progenitors to differentiate into monocytes, cDC, and pDC after stimulation of canonical Wnt signaling. (A) The scatter plot shows the total number of human cells recovered from cocultures of Wnt3a- or LiCl-pretreated human progenitors with murine bone marrow stromal cell line ST2, expressed as relative percentage to their control counterparts, from eight individual experiments. (B) The numbers of CD14⁺ cells, cDC, and pDC recovered from cocultures performed with Wnt3a (gray bars)- or LiCl (black bars)-pretreated progenitors are shown. Data represent the mean (\pm SD) of five to eight independent experiments, expressed relative to the numbers recovered under control conditions (open bars; referred as 100%). *, $P \leq 0.05$; **, $P \leq 0.01$; ***, $P \leq 0.001$, by *t*-test single sample.

able, and we found reductions ranging from 15% to 60% in the five experiments performed. cDC also underwent a significant reduction in their numbers in cocultures seeded with pretreated human precursors. However, the impact of the pretreatment was significantly higher in the case of pDC, leading in all of the experiments to a decrease in the percentage and number of this cell population, which indicates a greater negative effect of β -catenin stabilization on pDC generation (Fig. 5B).

Stimulation of canonical Wnt pathway modifies the expression of cytokine receptors in thymic Lin⁻CD34⁺CD1a⁻ progenitors

Differentiation and expansion of thymic precursors depend on their response to cytokines, such as SCF, IL-7, Flt3L, and IL-15. Therefore, we studied the pattern of expression of their receptors (CD117, CD127, CD135, and CD122, respectively) on Wnt3a- and LiCl-pretreated CD34⁺CD1a⁻ progenitors as a possible cause for the results obtained after transient stabilization of β -catenin.

After 12 h of culture in control conditions, 50–60% of Lin⁻CD34⁺CD1a⁻ cells expressed in their membrane receptors for SCF (CD117), whereas the percentage of CD127⁺ or CD135⁺ progenitors was higher, corresponding to 65% and 75% of CD34⁺CD1a⁻ cells, respectively. On the other hand, CD122 expression was restricted to a minor proportion of cell progenitors, which represented <5% of this thymic population (Fig. 6A). As a result of the transient stabilization of β -catenin, we observed that the progenitors did not change their expression of CD117, whereas there was a decrease in the percentage of CD34⁺ cells expressing Flt3 on their cell surface, most noticeably in the precursors treated with LiCl. By contrast, the percentage of CD122-positive cells increased after Wnt3a or LiCl treatment, reaching approximately 10% of cell precursors, and Wnt3a but not LiCl treatment increased the proportions of CD127⁺ thymic cell progenitors (Fig. 6A).

As the cytokine Flt3L is a crucial factor to promote the development of cDC and pDC in vivo and in vitro [36, 37], and the expression of its receptor is notably reduced after treatment with

Wnt3a or LiCl, we considered the possibility that the significant reduction observed in the number of recovered cells from cocultures established with ST2 cells and pretreated progenitors could be reversed, increasing Flt3L doses. However, the results obtained from these additional experiments showed that even tenfold increases in concentration of Flt3L failed to reverse the reduction in the absolute number of cells, as well as the percentage of pDC recovered from cocultures seeded with progenitors pretreated with LiCl (Fig. 6B). Furthermore, corroborating the conclusion that transient stabilization of β -catenin induced a loss of Flt3L responsiveness in CD34⁺CD1a⁻ cells, we demonstrated that the down-regulation of Flt3 expression observed in thymic progenitors correlated to the inhibition of Flt3L-induced STAT5 phosphorylation [38, 39] in Wnt3a- and LiCl-pretreated thymic progenitors (Fig. 6C).

CD34⁺CD1a⁻ progenitors change their transcription factor profile in response to β -catenin stabilization

In CD34⁺CD1a⁻ thymic progenitors, we evaluated by quantitative RT-PCR whether transient β -catenin stabilization affected the expression of different transcription factors that determine their lineage output [40]. Variations between samples were corrected by normalizing against the expression of two endogenous controls, GAPDH and GNB2L1. The results obtained showed that the stabilization of β -catenin caused by treatment with LiCl did not affect the levels of transcripts for Spi-B, GATA-2, GATA-3, and ID2 genes significantly, and those for ETS1 decreased only slightly when compared with control cells. In contrast, LiCl treatment caused a 50% increase in the levels of transcripts for Hes-1 and PU.1 in thymic progenitors, and remarkably, the amount of ID3 transcripts doubled that found in control cells (Fig. 7A).

To emphasize the impact of LiCl pretreatment, we performed additional assays to compare the transcription factor profile of control and LiCl-pretreated progenitors after responding to differentiation signals. In this set of experiments, RNA was obtained after two consecutive culture periods. The first culture step was equivalent to that performed in previous experiments; hence, the progenitors were maintained under control conditions or in the

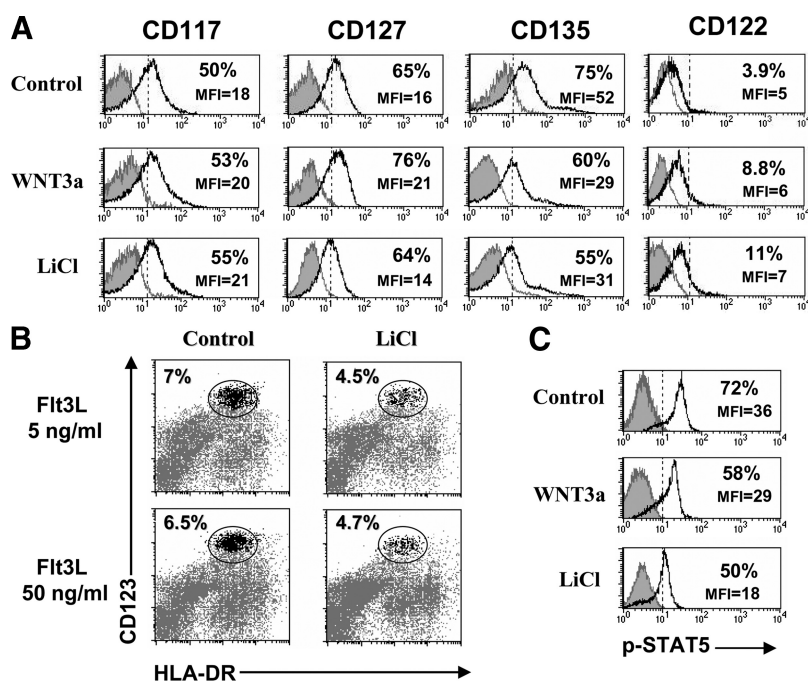


Figure 6. (A) Cytokine receptor expression after transient stimulation of canonical Wnt signaling in thymic CD34⁺CD1a[−] progenitors. After 12 h of culture in the absence (Control) or presence of Wnt3a or LiCl treatment, CD34⁺CD1a[−] progenitors were stained with anti-CD117, anti-CD127, anti-CD135, and anti-CD122 and then analyzed by flow cytometry. Shadow histograms indicate background fluorescence. The percentage of positive cells, determined according to background staining, and the total mean fluorescence intensity are shown in each histogram. Data are representative of four independent experiments. (B) High doses of Flt3L failed to reverse the reduction of the pDC population from cocultures of LiCl-pretreated progenitors and ST2 cells. Cocultures of thymic CD34⁺CD1a[−] control or LiCl-pretreated progenitors and ST2 cells were performed with different concentrations of Flt3L (5 ng/ml or 50 ng/ml), as described in Materials and Methods. Dot plots show the percentage of pDC (CD123^{high}HLA-DR^{low}) recovered from these cocultures, where in the case of 5 ng/ml, the number of human cells recovered from LiCl-pretreated cocultures was 80% of control cocultures, whereas in the case of 50 ng/ml, it was 60% of control. Data are representative of three independent experiments. (C) Transient stabilization of β -catenin inhibits Flt3L-induced STAT5 phosphorylation (p-STAT5) in CD34⁺CD1a[−] cells. Control and Wnt3a- and LiCl-pretreated progenitors were cultured in the presence of 100

ng/ml Flt3L, and after 3 h, intracellular STAT5 tyrosine phosphorylation levels were analyzed by flow cytometry. Shadow histograms indicate background fluorescence. The percentage of positive cells, determined according to background staining, and the total mean fluorescence intensity are shown in each histogram. Data are representative of three independent experiments.

presence of LiCl for 12 h, whereas during the second culture step, control or LiCl-pretreated progenitors responded to IL-7, Flt3L, and SCF cytokine cocktail for only 6 h. Under these experimental conditions, the increment in transcripts for Hes-1 was maintained, but remarkably, the levels of transcripts for ID3 and GATA3 were two to three times higher in cells that had stabilized β -catenin before responding to the IL-7, Flt3L, and SCF cytokine cocktail. Moreover, ID2 levels in pretreated cells were also increased by 40% with respect to control progenitors (Fig. 7B). It is interesting to remark that control progenitors could largely differentiate to monocyte and DC lineages in response to these differentiation signals, whereas our previous results indicated that pretreated progenitors did not.

DISCUSSION

In the present work, we have shown that stimulation of canonical Wnt signaling in human intrathymic Lin[−]CD34⁺CD1a[−] progenitors modifies their subsequent lineage output in response to specific differentiation environments. Our results also indicate that this effect would be related to changes in their expression of the Flt3L receptor, crucial in the regulation of lineage choice and the maintenance/expansion of progenitors and alterations in the expression levels of various transcription factors, such as Hes-1 and ID3.

We have focused our interest in the effects of a transitory increment in β -catenin levels in the differentiation potential of multilineage thymic precursors [41, 42]. During a reduced period of time, we have induced canonical Wnt signaling artificially in a specific cell-differentiation stage, CD34⁺CD1a[−] thy-

mic progenitors, transiently increasing the level of active β -catenin. This experimental strategy allows investigation of the effects that canonical Wnt signaling could exert only on early thymic progenitors, avoiding that the final result can be masked by the diverse effects of Wnt signaling on distinct thymocyte subsets, as could occur with a continuous treatment. In addition, as thymic epithelium [43] and ST2 stromal cells [44] respond to Wnt signaling, we perform the treatment of thymic progenitors before their use in FTOC or cocultures to avoid affecting the differentiation of thymic progenitors through modifications in the stromal microenvironment.

Previous studies performed in mice have attempted to analyze the function of canonical Wnt signaling during T cell differentiation, obtaining conflicting results. The genetic strategies used in these studies, leading to sustained activation or impairment of canonical Wnt signaling, produced distinct results depending on the target gene and the stage of thymocyte differentiation that underwent the genetic modification [13, 14, 24, 45]. Therefore, activation of the canonical Wnt pathway by overexpressing activated forms of β -catenin led to different effects depending on the promoter that controlled expression of mutant β -catenin [8–12, 26, 27]. Intriguingly, conditional β -catenin deletion under control of the lck promoter impairs T cell development [45], and if this deletion occurs earlier, in HSC, the thymus is not affected [46, 47]. On the other hand, attenuation of Wnt signaling, by overexpression of inhibitory molecules such Dkk1 [19] or Fzd soluble receptors [21], produces a blockage of T cell development at the DN differentiation stage, which becomes total in the case of Dkk1 overexpression. However, in these studies, the possible effects

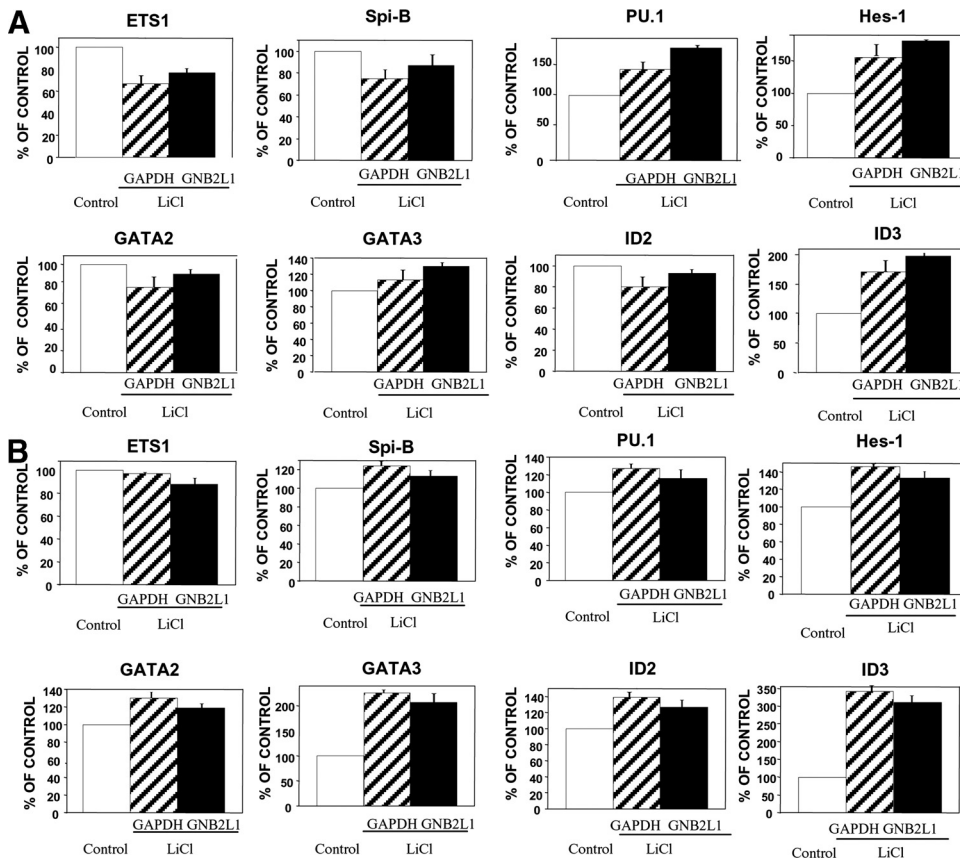


Figure 7. Transient stabilization of β -catenin changes the $CD34^+CD1a^-$ transcription factor profile. (A) Expression of different transcription factors in LiCl-pretreated progenitors, expressed relative to control values (referred as 100%). Variations between samples were corrected by normalizing against the expression of two endogenous controls, GAPDH (hatched bars) and GNB2L1 (black bars). (B) Quantitative RT-PCR analysis of transcriptional factor expression in $CD34^+CD1a^-$ cultured for 6 h with IL-7, Flt3L, and SCF after 12 h of pretreatment with LiCl.

on thymic epithelium were not evaluated, and recently, it has been reported that stabilization of β -catenin, exclusively in thymic epithelial cells, blocks thymocyte development [48]. Then, so far, no work has studied the involvement of the canonical Wnt pathway in modulating the differentiation potential of thymic progenitors.

Several authors have also reported that manipulation of canonical Wnt signaling affects expansion and differentiation potential of HSC. Artificial stimulation of the canonical Wnt pathway can restrict differentiation of primitive HSC, maintaining their engraftment potential [49], but sustained autocrine Wnt3a signaling compromises hematopoiesis [50]. Constitutively active β -catenin causes a severe disruption of hematopoiesis [9, 10], leading to exhaustion of a long-term stem-cell pool [10] and affecting myeloid progenitors, erythroid differentiation, and development of common lymphoid progenitors [9]. Accordingly, differentiation of B cells and pDC is blocked completely when primitive HSC are cultured onto Wnt3a-expressing OP9 stromal cells, and cDC development is not compromised, but modifications on OP9 stromal cells could also account for these effects [50].

Our results show that the thymic $CD34^+CD1a^-$ cell population, which includes the most immature thymic progenitors with the capacity to differentiate into T cells, NK cells, monocytes, and DC, markedly increases the levels of active β -catenin upon treatment with LiCl or Wnt3a, demonstrating the activation of the canonical Wnt signaling route. These pretreated progenitors were used in different experimental approaches to

study their differentiation potential and generated increased numbers of NK cells, whereas by contrast, showed less capacity to expand and differentiate toward monocyte and DC lineages, observing the greatest effect on pDC differentiation. As the activation of canonical Wnt signaling is previous to seed differentiation cultures, in our system, the transient stabilization of β -catenin modifies intrinsic characteristics of the thymic progenitors.

The mechanisms that control lineage output from $CD34^+$ thymic progenitors involve the integration of signals initiated in response to cytokines and the activity of specific transcription factors. In this scenario, the cytokine Flt3L is sufficient and essential to support the commitment and differentiation of hematopoietic precursors to DC lineage [36, 37], and our results demonstrate that activation of canonical Wnt signaling in $CD34^+CD1a^-$ progenitors markedly reduces the surface expression of receptors for this cytokine, which results in the inhibition of Flt3L-induced STAT5 phosphorylation. Therefore, the capacity of thymic progenitors to proliferate or survive in response to Flt3L, and in correlation, its potential to differentiate into monocytes, cDC, and pDC would be compromised after β -catenin stabilization. Consequently, this effect could account for the reduction observed in the number of cells yielded from the monocyte-DC differentiation assays, despite the increased viability of thymic progenitors. The reduction in Flt3 expression could merely decrease the sensitivity of progenitors to this signal, or in contrast, the reduced percentage of Flt3⁺ cells would be reflecting a modification in the compo-

sition of the thymic progenitor subpopulation after activation of canonical Wnt signaling. The increment in the percentage of CD122-positive progenitors observed after Wnt3a and LiCl pretreatment could agree with this possibility and with the enhancement of NK cell differentiation. Interestingly, we demonstrate that this effect is not reverted by increasing Flt3L doses and also show that the levels of various transcription factors are modified after activation of the canonical Wnt pathway.

Among transcription factors whose expression changes after giving a boost in canonical Wnt signaling, ID3, whose levels in LiCl-treated progenitors double those found in control, non-treated cells, stands out. ID3 is an inhibitor of the transcriptional activity of E2A proteins, E12 and E47, involved in the differentiation of many cell types. Enforced expression of ID3 by retrovirus-mediated gene transfer inhibits the development of CD34⁺CD1a[−] thymic progenitors into T cells and pDC and enhances the production of NK cells [35, 51]. In agreement, in our system, the transient activation of β -catenin enhances NK yields from human thymic progenitors and reduces the production of pDC. However, although FTOC seeded with LiCl-pretreated progenitors yield higher numbers of DN thymocytes, we cannot affirm conclusively that T cell lineage is affected. Nevertheless, the increment of ID3 levels generated after retroviral transduction, besides being constitutive, could be higher than that induced after transient Wnt signaling activation. In any case, the effect of canonical Wnt signaling in thymic progenitors is not merely an increment in ID3 transcripts. We also find an increment in the level of Hes-1 transcripts. Previous reports have demonstrated that the canonical Wnt pathway enhances Notch signaling, increasing the amount of Notch1 intracellular domain, which triggers an increment in Hes-1 transcription [52, 53]. In addition, Wnt signaling activation promotes the transcription of Notch1 [12] and its ligand Jagged1 [54], which in turn, would augment the subsequent Notch-dependent response. The increment in Notch1 signaling could be one of the factors that causes the inhibition of myeloid differentiation and the increment in the thymic DN population observed after activation of β -catenin [42].

Regarding NK cell development, cord-blood CD34⁺ cells cultured with low densities of Delta1^{ext-IgG} fusion proteins, which induce a small increase in Hes-1 expression [55], generate higher numbers of NK cells than progenitors cultured without fusion proteins [53]. In contrast, elevated densities of Delta1 [53] or sustained Notch1 activation after the intracellular portion of the Notch receptor 1 retroviral transduction [42] result in blockage of NK cell differentiation. These results indicate that the intensity of Notch signaling regulates NK lineage commitment and differentiation and account for the existence of an optimal level of Notch signaling required for the promotion of NK development. Accordingly, Wnt3a can inhibit NK cell differentiation by enhancing the level of Notch1 signaling to exceed a threshold that favors T cell development [53]. The increment in Hes-1 levels observed in LiCl-treated progenitors is quite low compared with that reported after culturing CD34⁺ progenitors with Delta1^{ext-IgG} fusion proteins [55]; then, we can assume that does not exceed the optimal level for NK differentiation.

On the other hand, controversial results have been reported regarding Notch1 signaling and pDC differentiation, mainly as a result of differences in the origin of CD34⁺ cell progenitors used in these studies (cord blood vs. thymus) and the amount of Notch1 ligand provided to CD34⁺ progenitors. Thus, Dontje et al. [56] demonstrated that CD34⁺CD1a[−] thymic progenitors cultured onto the OP9 stromal cell line expressing human Delta-like 1 increase GATA-3 expression and down-modulate Spi-B blocking pDC differentiation. In contrast, Olivier et al. [57] showed that cord-blood CD34⁺ progenitors require Notch1 signaling to differentiate into pDC and are blocked after γ -secretase inhibition, and their culture onto OP9-DL1 cells increases pDC yields.

In conclusion, we show that transient stabilization of β -catenin alters the lineage output from CD34⁺CD1a[−] thymic progenitors, impairing their capacity to differentiate into monocyte or DC lineages while promoting NK cell production. Modifications in factors that mediate CD34⁺CD1a[−] expansion and differentiation, such as the expression of Flt3 or Hes-1 and ID3 transcription levels, account for those results.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants BFU2006-00651 and BFU2007-65520 from the Ministerio de Educación y Ciencia, RD06/0010/0003 from the Instituto de Salud Carlos III, GR74/07-910552 from the Universidad Complutense y Comunidad Autónoma de Madrid, and PR34/07-15867 from the Universidad Complutense and Grupo Santander. We thank Dr. F. Villagrà and the Pediatric Cardiosurgery Units from Hospital Madrid-Montepíncipe and Hospital 12 de Octubre for the thymus samples and Dr. M. L. Gaspar for the gift of murine bone marrow stromal cell line ST2.

REFERENCES

- Melichar, H., Kang, J. (2007) Integrated morphogen signal inputs in gammadelta versus alphabeta T-cell differentiation. *Immunol. Rev.* **215**, 32–45.
- Nusse, R. (2005) Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res.* **15**, 28–32.
- Staal, F. J., Clevers, H. C. (2005) WNT signaling and hematopoiesis: a WNT–WNT situation. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 21–30.
- Clevers, H. (2006) Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* **127**, 469–480.
- Staal, F. J., Luis, T. C., Tiemessen, M. M. (2008) WNT signaling in the immune system: WNT is spreading its wings. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 581–593.
- Staal, F. J., Clevers, H. C. (2003) Wnt signaling in the thymus. *Curr. Opin. Immunol.* **15**, 204–208.
- Kawano, Y., Kypta, R. (2003) Secreted antagonists of the Wnt signaling pathway. *J. Cell Sci.* **116**, 2627–2634.
- Reya, T., Duncan, A. W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D. C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R., Weissman, I. L. (2003) A role for Wnt signaling in self-renewal of hematopoietic stem cells. *Nature* **423**, 409–414.
- Kirstetter, P., Anderson, K., Porse, B. T., Jacobsen, S. E., Nerlov, C. (2006) Activation of the canonical Wnt pathway leads to loss of hematopoietic stem cell repopulation and multilineage differentiation block. *Nat. Immunol.* **7**, 1048–1056.
- Scheller, M., Huelsken, J., Rosenbauer, F., Taketo, M. M., Birchmeier, W., Tenen, D. G., Leutz, A. (2006) Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive β -catenin activation. *Nat. Immunol.* **7**, 1037–1047.
- Baba, Y., Garrett, K. P., Kincade, P. W. (2005) Constitutively active β -catenin confers multilineage differentiation potential on lymphoid and myeloid progenitors. *Immunity* **23**, 599–609.

12. Baba, Y., Yokota, T., Spits, H., Garrett, K. P., Hayashi, S., Kincade, P. W. (2006) Constitutively active β -catenin promotes expansion of multipotent hematopoietic progenitors in culture. *J. Immunol.* **177**, 2294–2303.
13. Gounari, F., Aifantis, I., Khazaie, K., Hoeflinger, S., Harada, N., Taketo, M. M., von Boehmer, H. (2001) Somatic activation of β -catenin bypasses pre-TCR signaling and TCR selection in thymocyte development. *Nat. Immunol.* **2**, 863–869.
14. Mulroy, T., Xu, Y., Sen, J. M. (2003) β -Catenin expression enhances generation of mature thymocytes. *Int. Immunol.* **15**, 1485–1494.
15. Verbeek, S., Izon, D., Hofhuis, F., Robanus-Maandag, E., te Riele, H., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Wilson, A., MacDonald, H. R., Clevers, H. (1995) An HMG-box-containing T-cell factor required for thymocyte differentiation. *Nature* **374**, 70–74.
16. Schilham, M. W., Wilson, A., Moerer, P., Benaissa-Trouw, B. J., Cumano, A., Clevers, H. C. (1998) Critical involvement of Tcf-1 in expansion of thymocytes. *J. Immunol.* **161**, 3984–3991.
17. Goux, D., Coudert, J. D., Maurice, D., Scarpellino, L., Jeannet, G., Piccolo, S., Weston, K., Huelsken, J., Held, W. (2005) Cooperating pre-T-cell receptor and TCF-1-dependent signals ensure thymocyte survival. *Blood* **106**, 1726–1733.
18. Ioannidis, V., Beermann, F., Clevers, H., Held, W. (2001) The β -catenin–TCF-1 pathway ensures CD4(+)CD8(+) thymocyte survival. *Nat. Immunol.* **2**, 691–697.
19. Staal, F. J., Meeldijk, J., Moerer, P., Jay, P., van de Weerd, B. C., Vainio, S., Nolan, G. P., Clevers, H. (2001) Wnt signaling is required for thymocyte development and activates Tcf-1 mediated transcription. *Eur. J. Immunol.* **31**, 285–293.
20. Staal, F. J., Weerkamp, F., Langerak, A. W., Hendriks, R. W., Clevers, H. C. (2001) Transcriptional control of T lymphocyte differentiation. *Stem Cells* **19**, 165–179.
21. Weerkamp, F., Baert, M. R., Naber, B. A., Koster, E. E., de Haas, E. F., Atkuri, K. R., van Dongen, J. J., Herzenberg, L. A., Staal, F. J. (2006) Wnt signaling in the thymus is regulated by differential expression of intracellular signaling molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 3322–3326.
22. Pongracz, J. E., Parnell, S. M., Jones, T., Anderson, G., Jenkinson, E. J. (2006) Overexpression of ICAT highlights a role for catenin-mediated canonical Wnt signaling in early T cell development. *Eur. J. Immunol.* **36**, 2376–2383.
23. Mulroy, T., McMahon, J. A., Burakoff, S. J., McMahon, A. P., Sen, J. (2002) Wnt-1 and Wnt-4 regulate thymic cellularity. *Eur. J. Immunol.* **32**, 967–971.
24. Hsu, W., Shakra, R., Costantini, F. (2001) Impaired mammary gland and lymphoid development caused by inducible expression of Axin in transgenic mice. *J. Cell Biol.* **155**, 1055–1064.
25. Liang, H., Coles, A. H., Zhu, Z., Zayas, J., Jurecic, R., Kang, J., Jones, S. N. (2007) Noncanonical Wnt signaling promotes apoptosis in thymocyte development. *J. Exp. Med.* **204**, 3077–3084.
26. Yu, Q., Sen, J. M. (2007) β -Catenin regulates positive selection of thymocytes but not lineage commitment. *J. Immunol.* **178**, 5028–5034.
27. Yu, Q., Xu, M., Sen, J. M. (2007) β -Catenin expression enhances IL-7 receptor signaling in thymocytes during positive selection. *J. Immunol.* **179**, 126–131.
28. Staal, F. J., Weerkamp, F., Baert, M. R., van den Burg, C. M., van Noort, M., de Haas, E. F., van Dongen, J. J. (2004) Wnt target genes identified by DNA microarrays in immature CD34+ thymocytes regulate proliferation and cell adhesion. *J. Immunol.* **172**, 1099–1108.
29. Weerkamp, F., Pike-Overzet, K., Staal, F. J. (2006) T-sing progenitors to commit. *Trends Immunol.* **27**, 125–131.
30. Ciofani, M., Zuniga-Pflucker, J. C. (2007) The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**, 463–493.
31. Spits, H. (2002) Development of $\alpha\beta$ T cells in the human thymus. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 760–772.
32. Blom, B., Spits, H. (2006) Development of human lymphoid cells. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 287–320.
33. Gutierrez-Frias, C., Sacedon, R., Hernandez-Lopez, C., Cejalvo, T., Crompton, T., Zapata, A. G., Varas, A., Vicente, A. (2004) Sonic hedgehog regulates early human thymocyte differentiation by counteracting the IL-7-induced development of CD34+ precursor cells. *J. Immunol.* **173**, 5046–5053.
34. Hernandez-Lopez, C., Varas, A., Sacedon, R., Jimenez, E., Munoz, J. J., Zapata, A. G., Vicente, A. (2002) Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for early human T-cell development. *Blood* **99**, 546–554.
35. Spits, H., Couwenberg, F., Bakker, A. Q., Weijer, K., Uittenbogaart, C. H. (2000) Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into pre-dendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2. *J. Exp. Med.* **192**, 1775–1784.
36. McKenna, H. J. (2001) Role of hematopoietic growth factors/Flt3 ligand in expansion and regulation of dendritic cells. *Curr. Opin. Hematol.* **8**, 149–154.
37. Laouar, Y., Welte, T., Fu, X. Y., Flavell, R. A. (2003) STAT3 is required for Flt3L-dependent dendritic cell differentiation. *Immunity* **19**, 903–912.
38. Zhang, S., Fukuda, S., Lee, Y., Hango, G., Cooper, S., Spolski, R., Leonard, W. J., Broxmeyer, H. E. (2000) Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat)5a but not Stat5b for Flt3-dependent signaling. *J. Exp. Med.* **192**, 719–728.
39. Chung, K. Y., Morrone, G., Schuringa, J. J., Wong, B., Dorn, D. C., Moore, M. A. (2005) Enforced expression of an Flt3 internal tandem duplication in human CD34+ cells confers properties of self-renewal and enhanced erythropoiesis. *Blood* **105**, 77–84.
40. Anderson, M. K. (2006) At the crossroads: diverse roles of early thymocyte transcriptional regulators. *Immunol. Rev.* **209**, 191–211.
41. Hao, Q. L., George, A. A., Zhu, J., Barsky, L., Zielinska, E., Wang, X., Price, M., Ge, S., Crooks, G. M. (2008) Human intrathymic lineage commitment is marked by differential CD7 expression: identification of CD7–lymphoid-myeloid thymic progenitors. *Blood* **111**, 1318–1326.
42. Garcia-Peydro, M., de Yébenes, V. G., Toribio, M. L. (2006) Notch1 and IL-7 receptor interplay maintains proliferation of human thymic progenitors while suppressing non-T cell fates. *J. Immunol.* **177**, 3711–3720.
43. Pongracz, J., Hare, K., Harman, B., Anderson, G., Jenkinson, E. J. (2003) Thymic epithelial cells provide WNT signals to developing thymocytes. *Eur. J. Immunol.* **33**, 1949–1956.
44. Yamane, T., Kunisada, T., Tsukamoto, H., Yamazaki, H., Niwa, H., Takada, S., Hayashi, S. I. (2001) Wnt signaling regulates hemopoiesis through stromal cells. *J. Immunol.* **167**, 765–772.
45. Xu, Y., Banerjee, D., Huelsken, J., Birchmeier, W., Sen, J. M. (2003) Deletion of β -catenin impairs T cell development. *Nat. Immunol.* **4**, 1177–1182.
46. Koch, U., Wilson, A., Cobas, M., Kemler, R., MacDonald, H. R., Radtke, F. (2008) Simultaneous loss of β - and γ -catenin does not perturb hematopoiesis or lymphopoiesis. *Blood* **111**, 160–164.
47. Jeannet, G., Scheller, M., Scarpellino, L., Duboux, S., Gardiol, N., Back, J., Kuttler, F., Malanchi, I., Birchmeier, W., Leutz, A., Huelsken, J., Held, W. (2008) Long-term, multilineage hematopoiesis occurs in the combined absence of β -catenin and γ -catenin. *Blood* **111**, 142–149.
48. Zuklys, S., Gill, J., Keller, M. P., Hauri-Hohl, M., Zhanybekova, S., Balciunaite, G., Na, K. J., Jeker, L. T., Hafen, K., Tsukamoto, N., Amagai, T., Taketo, M. M., Krenger, W., Hollander, G. A. (2009) Stabilized β -catenin in thymic epithelial cells blocks thymus development and function. *J. Immunol.* **182**, 2997–3007.
49. Willert, K., Brown, J. D., Danenberg, E., Duncan, A. W., Weissman, I. L., Reya, T., Yates III, J. R., Nusse, R. (2003) Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* **423**, 448–452.
50. Malhotra, S., Baba, Y., Garrett, K. P., Staal, F. J., Gerstein, R., Kincade, P. W. (2008) Contrasting responses of lymphoid progenitors to canonical and noncanonical Wnt signals. *J. Immunol.* **181**, 3955–3964.
51. Heemskerk, M. H., Blom, B., Nolan, G., Stegmann, A. P., Bakker, A. Q., Weijer, K., Res, P. C., Spits, H. (1997) Inhibition of T cell and promotion of natural killer cell development by the dominant negative helix loop helix factor Id3. *J. Exp. Med.* **186**, 1597–1602.
52. Duncan, A. W., Rattis, F. M., DiMascio, L. N., Congdon, K. L., Pazianos, G., Zhao, C., Yoon, K., Cook, J. M., Willert, K., Gaiano, N., Reya, T. (2005) Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat. Immunol.* **6**, 314–322.
53. Aoyama, K., Delaney, C., Varnum-Finney, B., Kohn, A. D., Moon, R. T., Bernstein, I. D. (2007) The interaction of the Wnt and Notch pathways modulates natural killer versus T cell differentiation. *Stem Cells* **25**, 2488–2497.
54. Katoh, M., Katoh, M. (2006) Notch ligand, JAG1, is evolutionarily conserved target of canonical WNT signaling pathway in progenitor cells. *Int. J. Mol. Med.* **17**, 681–685.
55. Delaney, C., Varnum-Finney, B., Aoyama, K., Brashem-Stein, C., Bernstein, I. D. (2005) Dose-dependent effects of the Notch ligand Delta1 on ex vivo differentiation and in vivo marrow repopulating ability of cord blood cells. *Blood* **106**, 2693–2699.
56. Dontje, W., Schotte, R., Cupedo, T., Nagasawa, M., Scheeren, F., Gimeno, R., Spits, H., Blom, B. (2006) δ -Like1-induced Notch1 signaling regulates the human plasmacytoid dendritic cell versus T-cell lineage decision through control of GATA-3 and Spi-B. *Blood* **107**, 2446–2452.
57. Olivier, A., Lauret, E., Gonin, P., Galy, A. (2006) The Notch ligand Delta-1 is a hematopoietic development cofactor for plasmacytoid dendritic cells. *Blood* **107**, 2694–2701.

KEY WORDS:

Wnt • NK cells • DC • ID3 • Hes-1 • Flt3L

Interplay between BMP4 and IL-7 in human intrathymic precursor cells

Alberto Varas,^{1,†,*} Rosa Sacedón,^{1,†} Laura Hidalgo,¹ Víctor G. Martínez,¹ Jaris Valencia,¹ Teresa Cejalvo,² Agustín Zapata,² Carmen Hernández-López¹ and Angeles Vicente¹

Department of Cell Biology; Faculties of ¹Medicine and ²Biology; Complutense University; Madrid, Spain

[†]These authors contributed equally to this work.

Key words: human thymus, CD34⁺ cells, bone morphogenetic proteins, Hedgehog proteins

Bone morphogenetic proteins (BMPs) play a pivotal role during vertebrate embryogenesis and organogenesis, and have also been described to function in regulating cell fate and determination in self-renewing tissues in adults. Recent results have demonstrated that the different components of the BMP2/4 signaling pathway are expressed in the human thymus. In this study, we provide evidence that BMP4 and IL-7 interplay is important in the maintenance of the human thymic progenitor population. Intrathymic CD34⁺ cells express BMP receptors (BMPRIA, BMPRIB, ActRIA, BMPRII), signal transduction molecules (Smad1, 5, 8 and 4), and produce BMP4. Neutralization of endogenous BMP4 by treatment with the antagonist Noggin reduces thymic precursor cell survival, and the addition of exogenous BMP4 decreases their proliferation. The treatment of chimeric human-mouse fetal thymus organ cultures with BMP4 inhibits cell expansion, arrests thymocyte differentiation, and leads to the accumulation of human CD34⁺ precursor cells. This effect is mainly attributed to the ability of BMP4 to counteract the IL-7-induced proliferation and differentiation of CD34⁺ cells. BMP4 downregulates in the precursor cell population the expression of CD127 and inhibits the IL-7-dependent STAT5 phosphorylation. In addition, BMP signaling is promoted by IL-7. Our results also demonstrate that in thymic progenitors BMPs act downstream of Sonic Hedgehog, previously described to function as a maintenance factor for human intrathymic CD34⁺ precursor cells.

Do not distribute.

Introduction

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are secreted growth factors, which form a subgroup of the TGF β superfamily.¹ More than 20 BMP family members have already been described. They have been classified into several subgroups according to their structural similarities, and also include BMP-like molecules from various species, including dpp protein from *Drosophila melanogaster*.^{2,3} BMPs are dimeric proteins which, upon dimerization, are secreted and proteolytically cleaved. Once secreted, the BMP dimers initiate signaling by binding to a heterotetrameric complex constituted by transmembrane receptors, termed type I and type II, exhibiting serine/threonine kinase activity. The type II receptors are constitutively active kinases, which transphosphorylate type I receptors upon ligand binding. The type I receptors activate intracellular substrates by phosphorylation, and thus determine the specificity of intracellular signals. The main BMP receptors are constituted by the combination of type II BMP receptor (BMPRII) and the following type I receptors: type IA BMP receptor (BMPRIA)/ALK-3, type IB BMP receptor (BMPRIB)/ALK-6, and type IA Activin receptor (ActRIA)/ALK-2.³⁻⁷ BMP signal transduction to the nucleus is mediated by Smad protein family. Specifically, Smad1, Smad5 and Smad8 (also called BMP receptor-regulated Smads or BR-Smads) are

phosphorylated and activated by type I BMP receptors. Once phosphorylated, BR-Smads bind to Smad-4 forming a heteromeric complex that translocates into the nucleus where it regulates gene expression using different mechanisms.⁶⁻⁸

The Hedgehog (Hh) protein family is a group of secreted intercellular signaling molecules which, in mammals, is composed by three proteins: Sonic (Shh), Indian (Ihh) and Desert Hh (Dhh), and Shh is the best studied.^{9,10} Hh proteins undergo extensive post-translational modifications before being secreted.^{11,12} Upon secretion, all Hh proteins share a common signaling pathway where Patched (Ptc) and Smoothened (Smo) constitute the surface receptor complex. Ptc is the ligand binder, and Smo transduces the signal into the cell. In the absence of ligand, Ptc exerts an inhibitory effect on Smo activity that is abrogated after Hh binding.^{9,13,14} The intracellular signaling cascade initiated by Smo culminates in the activation of members of the Gli family of zinc finger transcription factors, Gli1, Gli2 and Gli3, which regulate the transcription of different target genes.¹⁵

Although BMP and Hh signaling pathways are known to play critical roles in vertebrate and invertebrate embryogenesis, determining cell fate and patterning during the development of many organs,^{10,16-20} several studies have demonstrated that BMPs and Hh proteins also function in cell fate determination of self-renewing tissues in the adult, such as the hematopoietic

*Correspondence to: Alberto Varas; Email: avaras@bio.ucm.es

Submitted: 08/17/09; Revised: 09/18/09; Accepted: 09/21/09

Previously published online: www.landesbioscience.com/journals/cc/article/10149

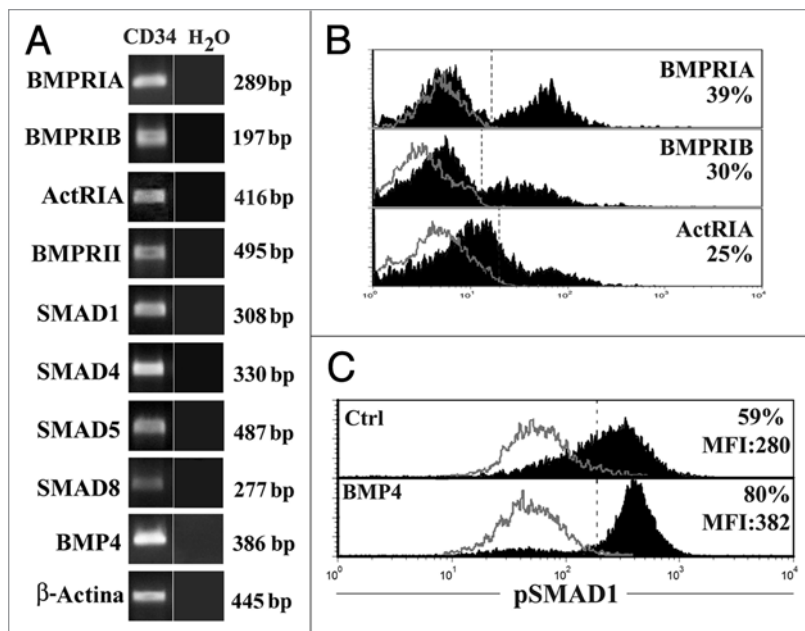


Figure 1. Human thymic precursor cells express BMP signaling pathway components. (A) RT-PCR analysis of the expression of different components of the BMP signaling pathway on isolated intrathymic CD34⁺ cells. Band sizes are indicated. H₂O served as negative control. (B) Surface expression of type I BMP receptors on thymic CD34⁺ cells. The percentages of positive cells are shown in each histogram. Grey histograms indicate background staining. Results are representative of five to eight independent experiments. (C) The levels of phosphorylated SMAD1 were determined by flow cytometry on thymic CD34⁺ cells cultured in the absence or presence of BMP4 for 12 h. The percentages of positive cells and their mean fluorescence intensities are indicated in the histograms. Grey histograms indicate background staining. Results are representative of two independent experiments.

and immune systems.²¹⁻²⁴ Different BMPs, and also Shh, have been demonstrated to participate in the control of the expansion and differentiation of human hematopoietic precursor cells, in synergy with several cytokines.²⁵⁻²⁸ In the murine thymus, both BMPs²⁹⁻³² and Hh proteins³³⁻⁴¹ have been described to regulate proliferation, survival and differentiation during early T-cell development. In humans, the three components of the Hh family are produced by thymic epithelial cells. Shh-producing epithelial cells are localized in the subcapsular and medullary areas, and Ihh- and Dhh-expressing epithelial cells appear distributed throughout the thymic parenchyma.⁴² In addition, thymic dendritic cells residing in the medulla and corticomedullary junction also produce Shh.⁴³ Surface expression of Ptc and Smo receptors is found mainly in immature thymocytes, thymic dendritic cells and also cortical and medullary epithelial cells,^{42,43} and Gli family members are differentially expressed by the different thymic cell subsets.⁴² Shh enhances the survival of intrathymic CD34⁺ precursors and also inhibits their IL-7-mediated proliferation and differentiation by downregulating CD127/IL-7R α expression and IL-7-dependent STAT5 phosphorylation, suggesting that Shh contributes to maintain the intrathymic progenitor cell population.⁴⁴ Regarding BMPs, cortical epithelial cells are the main producers of BMP4 and BMP2 in the human thymus, and both thymocytes and thymic epithelium express the BMP receptors, BMPRIA, BMPRIB and BMPRII, as well as the BR-SMADs

required for intracellular signaling.⁴⁵ Likewise, BMP4 treatment of chimeric human-mouse fetal thymus organ cultures (FTOC) results in reduced human cell recovery and inhibition of CD34⁺ progenitor cell differentiation.⁴⁵ In the current study we report that human intrathymic precursor cells express functional BMP receptors. The stimulation of the BMP signaling pathway increases the survival, inhibits the proliferation and differentiation induced by IL-7, and maintains the numbers of thymic CD34⁺ progenitors. We also show that BMP mediates Shh effects in thymic CD34⁺ precursor cells, indicating that the interplay between BMP and IL-7 signaling pathways is important for the maintenance of the intrathymic precursor cell population.

Results

BMP signaling pathway is functionally active in human thymic progenitor cells. We have previously reported that Shh may function as a maintenance factor for the intrathymic CD34⁺ progenitor cell population, promoting their survival and inhibiting their IL-7-induced proliferation and differentiation.⁴⁴ Likewise, we have also shown that the stimulation of BMP2/4 signaling pathway results in an arrested human thymocyte differentiation and an accumulation of CD34⁺ progenitor cells.⁴⁵ To know whether BMP2/4 signaling could also function in the maintenance of intrathymic CD34⁺

precursor cells, we first demonstrated by RT-PCR that human intrathymic CD34⁺ cells expressed the three type I BMP receptors, BMPRIA, BMPRIB and ActRIA, and the type II receptor BMPRII (Fig. 1A). Likewise, CD34⁺ cells expressed specific RNAs for BR-SMADs, Smad1, Smad5 and Smad8, as well as for Smad4 (Fig. 1A). The flow cytometric analysis showed that 35% (range 15–50%) of intrathymic CD34⁺ cells expressed BMPRIA, 31% (range 10–40%) expressed BMPRIB and 25% (range 15–45%) were positive for ActRIA (Fig. 1B). These data suggested that BMP signaling pathway is active in human thymic progenitor cells, and this was confirmed studying the effect of BMP addition on Smad1 phosphorylation. Smad1 is a receptor regulated Smad, directly phosphorylated and functionally activated by the BMP receptor upon BMP ligand binding.⁴⁶ As shown in Figure 1C, the levels of phosphorylated Smad1 notably increased after culture of CD34⁺ cells with BMP4.

BMP4 enhances the survival of human intrathymic precursor cells. We next evaluated the effects of BMP4 on cell survival of human intrathymic CD34⁺ cells. The addition of different doses of exogenous BMP4, ranging from 1 to 100 ng/ml, to precursor cell cultures always had minimal effects on the viability of CD34⁺ cells (Fig. 2). However, and since CD34⁺ precursors are able to produce BMP4 (Fig. 1A), the blockade of endogenous BMP activity using the BMP antagonist Noggin resulted in a marked decrease in CD34⁺ progenitor cell survival (Fig. 2).

BMP4 inhibits IL-7-induced proliferation and differentiation of thymic precursors and maintains the numbers of CD34⁺ cells. To investigate whether BMP4 signaling pathway is also able to influence the proliferative and differentiative effects induced by IL-7 on CD34⁺ cells, as previously demonstrated for Shh signaling,⁴⁴ suspension cultures of intrathymic CD34⁺ precursors were supplemented with BMP4 and/or IL-7. The addition of BMP4 induced a dose-dependent inhibition of cell proliferation, and with the highest dose (100 ng/ml) BMP4 treatment inhibited the proliferative rate by 25–35% (Fig. 3A). In contrast, IL-7 induced a strong proliferative response that, remarkably, underwent a drastic reduction by the presence of BMP4 (Fig. 3A).

Using chimeric human-mouse FTOC, it was also evident that BMP4 was able to inhibit the IL-7-dependent expansion of human thymocytes (Fig. 3B). Likewise, BMP4 blocked the IL-7-induced stimulation of thymocyte differentiation (Fig. 3B), while maintaining the numbers of CD34⁺ progenitor cells, which were increased over the control values (Fig. 3B).

The levels of IL-7R α /CD127 expression on BMP4-treated CD34⁺ cells were also analyzed and we found that CD127 expression was highly downregulated in the presence of BMP4 (Fig. 3C). In addition, this downregulation of IL-7R expression correlated with an inhibition of IL-7-induced STAT5 phosphorylation. Figure 3D shows that BMP-4 reduced the proportion of CD34⁺ cells which respond to IL-7 as assessed by STAT5 phosphorylation.

All these results indicate that BMP4 signaling promotes cell survival and induces a loss of sensitivity to IL-7 in CD34⁺ precursors, as we have also described for Shh.⁴⁴

BMP mediates Shh effects in human intrathymic CD34⁺ precursor cells. Bhardwaj et al.²⁵ reported that Shh modulates the cytokine-induced proliferation of human primitive hematopoietic cells via BMP4 regulation. To know whether the similarity in the effects exhibited by BMP4 and Shh was due to the fact that the action of BMP4 is downstream of the effects of Shh in CD34⁺ intrathymic precursor cells, we analyzed the effects of Shh on BMP receptor expression. The addition of Shh to CD34⁺ cell cultures mainly upregulated the expression of BMPRIA (Fig. 4A), while the presence of BMP4 in the cultures induced a notable decrease of the proportion of CD34⁺ precursor cells expressing Smo, the signaling component of the Hh receptor (Fig. 4B). Likewise, the presence of Shh stimulated autocrine BMP4 secretion by CD34⁺ cells (Fig. 4C) and, supporting these data, increased levels of phosphorylated Smad1 were also detected by flow cytometry when CD34⁺ cells were treated with Shh, similarly to those seen after BMP4 treatment (Fig. 4D).

It was also analyzed whether the anti-proliferative effects of Shh on CD34⁺ cells were BMP dependent, and for this purpose we used the BMP antagonist Noggin. Figure 4E shows that the addition of Noggin alone minimally affected the proliferation of CD34⁺ cells, in contrast to the inhibition of proliferation induced by Shh or BMP4. However, the presence of Noggin was able to reverse the inhibitory effects on CD34⁺ precursor cell proliferation induced by Shh (Fig. 4E).

We also studied the effects of the addition of the BMP antagonist Noggin in the IL-7-driven expansion of CD34⁺ intrathymic

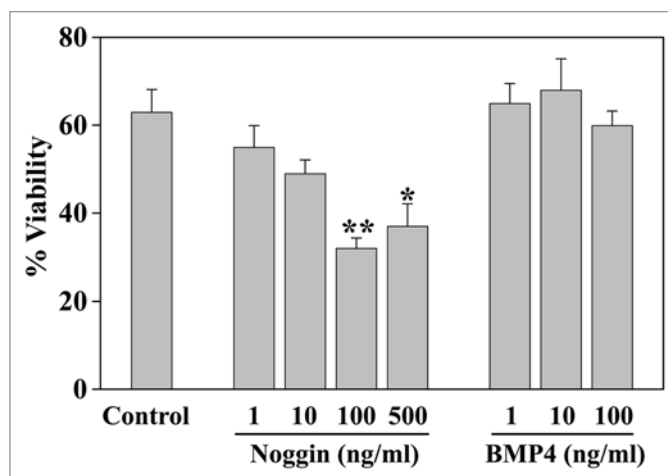


Figure 2. Endogenous BMP enhances the survival of human intrathymic CD34⁺ cells. Determination of intrathymic CD34⁺ cell viability after culture for 48 h in serum-free medium alone or supplemented with different doses of either BMP4 or the BMP antagonist Noggin (number of input cells, 10⁵). The percentages of viable cells were determined by staining with annexin V and propidium iodide. Viable cells were defined as annexin V negative and propidium iodide negative. Data represent the mean \pm SD of three to four independent experiments, including three cultures per point (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; by t-test).

precursor cells. The addition of Noggin alone hardly had any effect on IL-7-induced proliferation of CD34⁺ cells, but when added in combination with Shh, Noggin had the ability to reverse the inhibition of CD34⁺ cell proliferation induced by Shh (Fig. 5A). Likewise, Noggin was able to counteract the downregulation of IL-7R α expression induced by Shh (Fig. 5B). Therefore, these results strongly suggest that BMP mediates Shh signaling in intrathymic CD34⁺ progenitor cells.

IL-7 promotes the BMP signaling pathway. Interestingly, and supporting the interplay between BMP and IL-7, we also found that the BMP signaling pathway is promoted by IL-7. As can be seen in Figure 5C, the expression of BMPRIA, BMPRIB and ActRIA were highly upregulated on CD34⁺ cells cultured in the presence of IL-7, and the production of BMP4 ligand by human thymic epithelial cells was notably increased in the presence of IL-7 (Fig. 5D).

Discussion

In this study we demonstrate that the BMP4 signaling pathway inhibits the proliferation and differentiation of human intrathymic CD34⁺ precursor cells. BMP4 exerts these inhibitory effects counteracting the functions of IL-7, the main growth factor with prodifferentiative actions functioning in the human thymus.⁴⁷⁻⁵⁰ These effects are mediated by the BMP4-induced downregulation of IL-7R α expression and inhibition of IL-7-dependent STAT5 phosphorylation in CD34⁺ precursors. Similarly, we reported previously that Shh regulates early human thymocyte differentiation by counteracting the IL-7-induced development of CD34⁺ precursor cells.⁴⁴ The similarity in the effects shown by BMP4 and Shh is attributed to the fact that BMP4 acts as a downstream

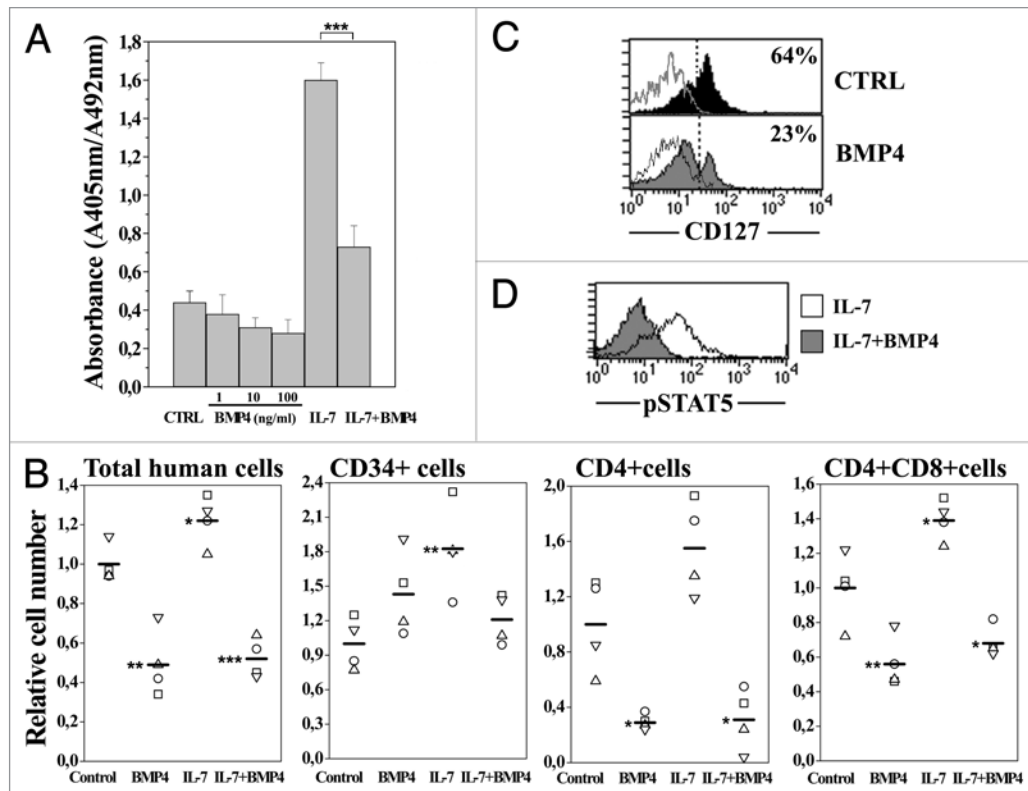


Figure 3. BMP4 inhibits the IL-7-mediated development of human thymic progenitor cells. (A) Determination of CD34⁺ precursor cell proliferation after culture for 48 h in serum-free medium alone or supplemented with different doses of BMP4, IL-7, or a combination of BMP4 plus IL-7. Cells were pulsed for 12 h with BrdU, and a specific kit was used to measure BrdU incorporation into newly synthesized DNA. Results are the mean \pm SD of three to four independent experiments, each with three cultures per point (** $p \leq 0.001$; by t-test). (B) SCID fetal thymic lobes were seeded with human thymic CD34⁺ precursor cells and organ-cultured for 10 days in the absence or presence of BMP4, IL-7 or BMP4 plus IL-7. Cells from the cultures were stained with anti-human CD45, CD4 and CD8, or anti-human CD45 and CD34. The numbers of human cells were calculated by multiplying the total number of cells per lobe by the percentage of human CD45⁺ cells determined by flow cytometry analysis. The proportions of human CD34⁺ precursors, immature CD4⁺ cells and CD4⁺ CD8⁺ thymocytes were analyzed and used to calculate the absolute number of each cell subset. The number of human cells recovered in each experiment was divided by the mean number of human cells recovered from the control cultures, to give the relative cell number of each human thymocyte subpopulation from four individual experiments. Asterisks represent statistically significant differences between control and treated cultures (* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; by t-test). The differences in mean between IL-7- and IL-7 + BMP4-treated cultures are also significant ($p \leq 0.01$). (C) The expression of CD127/IL-7R was analyzed on CD34⁺ cells cultured with or without BMP4 for 48 h. Percentages of positive cells are indicated in each histogram. Open histograms indicate background staining. Results are representative of three independent experiments. (D) Thymic CD34⁺ cells were cultured for 48 h in serum-free medium alone or supplemented with BMP4. For the last 12 h, IL-7 was added to the cultures, and CD34⁺ cells were then assessed for intracellular STAT5 phosphorylation. The results are representative of three separate experiments.

mediator of the inhibitory effects of Shh on CD34⁺ intrathymic precursor cells. Several evidences demonstrate this relationship between BMP4 and Shh signaling: Shh upregulates BMPR expression and induces autocrine BMP secretion on CD34⁺ cells, and the presence of the BMP antagonist Noggin is able to reverse the inhibition of CD34⁺ cell proliferation induced by Shh, both in the absence or presence of IL-7. In addition, Noggin also reverses the Shh-induced downregulation of IL7R α expression. Shh and BMP4 frequently interact and regulate, both positive and negatively, one another's expression or function, therefore establishing complex relationships. As we report here, different reports have also described that BMP mediates Shh activity in many systems during organogenesis⁵¹⁻⁵⁴ as well as in adult life.^{25,55,56}

In our previous work⁴⁴ we demonstrated, using the chimeric human-mouse FTOC system, that the addition of exogenous

Shh not only inhibits the expansion and differentiation of human thymocytes but also maintains increased numbers of CD34⁺ precursor cells and promotes their survival. These data were interpreted as evidence that Shh would function as a maintenance factor for intrathymic progenitors. Very similar results have been obtained here after BMP4 addition, and since BMP is mediating Shh effects, these results point out that the role played by BMP signaling in the maintenance of the intrathymic progenitor cell population must be more relevant than that played by Shh signaling. On this regard, several authors have described that BMP4 signal is required for self-renewal of embryonic stem cells,^{57,58} and for maintenance of germline stem cells in the *Drosophila* ovary.⁵⁸ Abrogation of BMP signaling results in loss of quiescence and deregulated proliferation in hair follicle stem cells^{59,60} and the culture of hematopoietic stem cells with BMP4

inhibits their proliferation and maintain their repopulation capacity.^{25,26} Also, in the murine thymus, BMP4 arrests thymocyte differentiation at the earliest intrathymic precursor stage (CD44⁺CD25⁺CD4⁺CD8⁺ cells),^{30,31} and inhibits their proliferation while enhancing their survival.³⁰

The relevance of the BMP regulation of IL-7-dependent proliferative and differentiative effects is further emphasized by the fact that IL-7 is also able to promote BMP signaling pathway. IL-7 induces the expression of BMP receptors on CD34⁺ cells and also enhances the secretion of BMP4 by thymic epithelial cells, showing that IL-7 stimulates the expansion and differentiation of intrathymic precursors but also induces the BMP4 signaling pathway which functions as a negative feedback control mechanism. Although the interplay between IL-7 and BMP is a novel finding and, to our knowledge, has not been described in another cell system previously, the interrelation between cytokines and BMPs has been widely described.^{25,26,28,61} In addition, different authors have reported a cytokine-mediated regulation of BMP and BMP receptor expression. BMP-4 expression is highly upregulated after short-term culture of human cord blood CD34⁺ CD38⁺ precursor cells with a cytokine cocktail (including IL-3, IL-6, Flt-3 ligand, SCF and G-CSF) which induces the survival and proliferation of hematopoietic progenitor cells.²⁵ The combination of IFN γ , IL-17, TNF α and TGF β strongly induces the production of BMP-2 by human mesenchymal stem cells,⁶² and IL-1 β and TNF α stimulate the expression of BMP-2 in human chondrocytes.⁶³ Likewise, IL-6 and TNF α regulate BMP receptor expression in human chondrocytes and bone cells, respectively.^{64,65}

Therefore, all these data provide evidence for the factors which regulate the population of progenitor cells in the human thymus and indicate that the balance between signals delivered by BMP and IL-7 pathways would be involved in the control of the maintenance of intrathymic precursors in an undifferentiated state as well as their expansion and differentiation along the T-cell lineage pathway.

Materials and Methods

Isolation of human intrathymic CD34⁺ cells. Human thymus samples from patients aged 1 month to 5 years undergoing corrective cardiac surgery were obtained and used according to the guidelines of the Medical Ethics Commission of Madrid-Montepríncipe and 12 de Octubre Hospitals (Madrid, Spain). Informed consent was provided according to the Declaration of Helsinki. Thymuses were dissected free of surrounding connective tissue and then gently disrupted with a potter homogenizer until completely disaggregated. To isolate thymic CD34⁺ precursors, thymocyte suspensions were enriched in immature thymocytes by using the sheep red blood cell rosetting technique followed by mAb-coupled magnetic bead treatment (Dynabeads; Dynal, Oslo, Norway) to deplete monocytes, T, B and NK cells as previously described.⁴⁴ CD34⁺ cells were then purified by magnetic sorting using a CD34 Progenitor Cell Selection System (Dynal) following the manufacturer's instructions. In any case, the purity of the recovered subpopulations was greater than 98%.

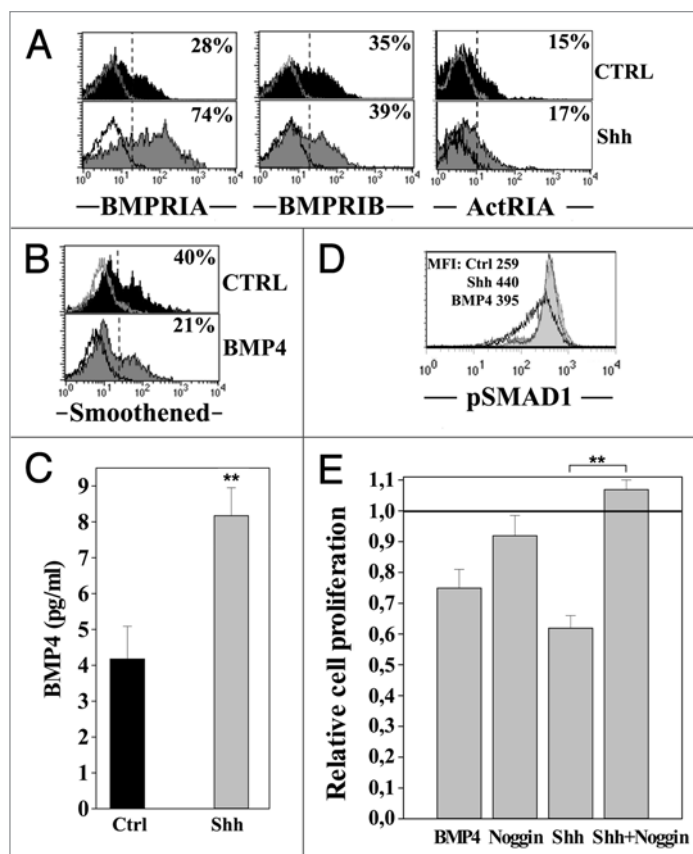


Figure 4. BMP mediates Shh effects on thymic CD34⁺ precursors. Intrathymic precursor cells were cultured for 48 h in the absence or presence of either Shh (A) or BMP4 (B), and the expression of BMPRIA, BMPRIB, ActRIA (A) and Smoothed (B) was determined by flow cytometry. Percentages of positive cells are indicated in each histogram. Open histograms indicate background staining. Results are representative of three independent experiments. (C) Purified CD34⁺ cells were cultured in the presence or absence of Shh for 12 h, and the levels of BMP4 were determined in the supernatants by ELISA. Data represent the mean \pm SD of two independent experiments (** $p \leq 0.01$; by t-test). (D) Phosphorylated SMAD1 levels were determined by flow cytometry on thymic CD34⁺ precursors cultured in the absence (thick line) or presence of either Shh (grey profile) or BMP4 (white profile) for 12 h. The mean fluorescence intensities are indicated in the histograms. (E) CD34⁺ precursor cells were cultured for 48 h with or without BMP4, Noggin, Shh or Shh plus Noggin. Cells were pulsed for 12 h with BrdU, and a specific kit was used to measure BrdU incorporation into newly synthesized DNA. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments, expressed relative to the mean of the control cultures (** $p \leq 0.01$; by t-test).

RT-PCR analysis. RNA isolation was performed using a Strataprep Total RNA Miniprep Kit (Stratagene Cloning Systems; La Jolla, CA), including a Dnase I digestion step, as recommended by the supplier, to avoid genomic DNA contamination. Total cDNA was synthesized with Superscript II RT polymerase (Invitrogen, Grand island, NY), according to the instructions of the commercial supplier, and then used as target in the PCR amplifications, which were performed using specific primer sets described previously,⁴⁵ as well as the following primer sets: ActRIA forward primer 3'-GGT TCC CAA TGA CCC AAG TTT-5', reverse primer 5'-CGA GCG AGG TTA GGG

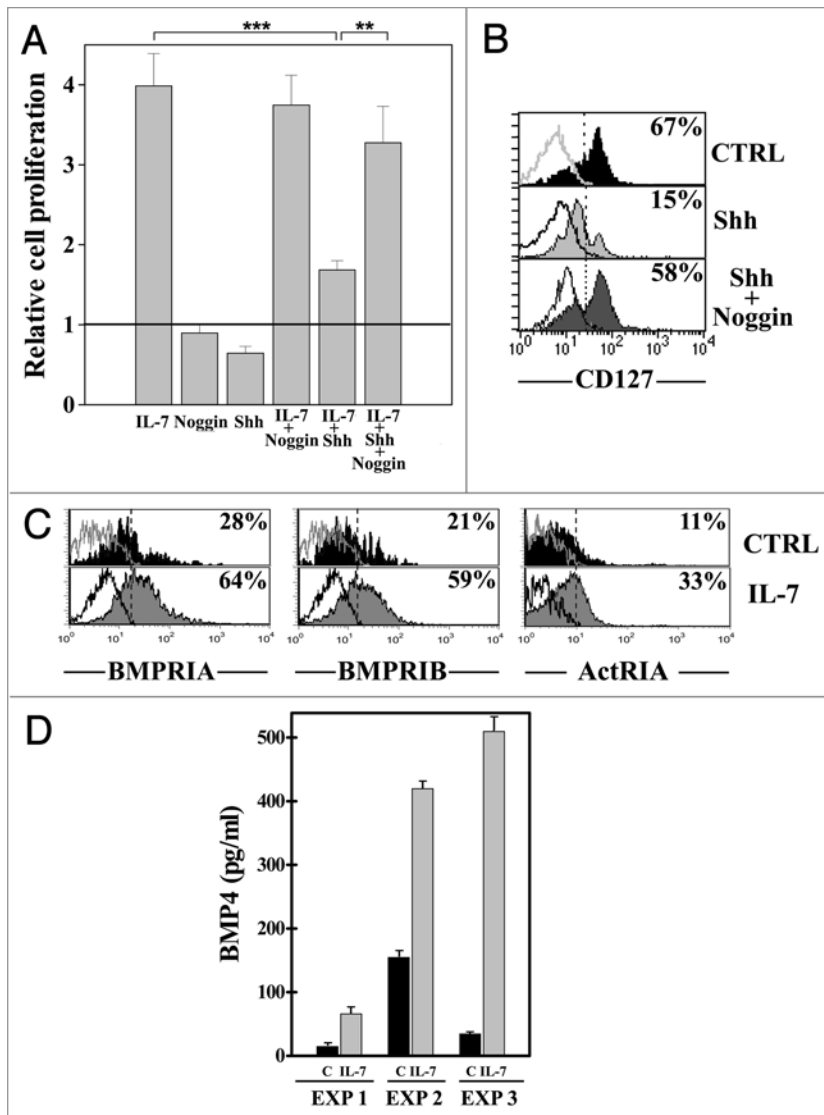


Figure 5. BMP and IL-7 interplay in thymic CD34⁺ cells. (A) CD34⁺ precursor cells were cultured for 48 h with or without IL-7, Noggin, Shh or combinations of IL-7, Shh and Noggin. Cells were pulsed for 12 h with BrdU, and a specific kit was used to measure BrdU incorporation into newly synthesized DNA. Data represent the mean ± SD of three independent experiments, expressed relative to the mean of the control cultures (**p ≤ 0.01; ***p ≤ 0.001; by t-test). (B) CD127/IL-7R expression was analyzed on CD34⁺ precursor cells cultured in the absence or presence of either Shh or Shh plus Noggin for 48 h. Percentages of positive cells are indicated in each histogram. Open histograms indicate background staining. Results are representative of three independent experiments. (C) Intrathymic CD34⁺ cells were cultured with or without IL-7 for 48 h and the expression of BMPRIA, BMPRIB and ActRIA was analyzed. The percentages of positive cells are indicated in the histograms. Open histograms indicate background staining. Results are representative of four independent experiments. (D) Thymic epithelial cells were cultured in the absence or presence of IL-7 and, after 48 h, the levels of BMP4 were measured in the supernatants by ELISA. Results from three independent experiments are shown. Data represent the mean ± SD from cultures performed in triplicate.

TGG TT-3' at 60° with a 416 bp product; primers designed from sequences available from the GenBank database (accession number ActRIA, NM_001105). All PCR reactions were performed on a Mastercycler gradient machine (Eppendorf; Hamburg, Germany) using AmpliTaqGold DNA polymerase (Applied

Biosystems; Foster City, CA) under the following conditions: 3 min at 94°C, 40 cycles of 45 sec at 94°C, 45 sec of each particular T annealing and, 45 sec at 72°C, followed by 10 min at 72°C. PCR products were resolved on a 2% agarose gel and the measured sizes were as expected.

Culture of thymic CD34⁺ precursors. Purified thymic CD34⁺ precursors (1 × 10⁵) were cultured in 96-well flat-bottom culture plates in 0.2 ml of AIMV serum-free medium (Invitrogen) in the presence of recombinant human (rh) IL-7 (1,000 U/ml; National Institute for Biological Standards and Control, Hertfordshire, UK), rhBMP-4 (100 ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN), rhNoggin (500 ng/ml; Fitzgerald Industries International, Concord, MA), or modified rhShh (100 ng/ml; kindly provided by Curis, Cambridge, MA). This Shh protein was octylated for high activity. In vitro modification of N-Shh (aa 25–199), with a lipophilic group on the N-terminal cysteine, significantly increases the specific activity (>30-fold) of *Escherichia coli*-derived N-Shh as measured by activation of Hh signal transduction in cultured cells. Octyl N-Shh is a hydrophobically modified version of the Shh signaling protein generated by coupling N-octyl-maleimide to the N-terminal cysteine of bacterially derived N-Shh. This modification represents a simple and efficient way to generate high, specific-activity Shh protein from bacterially expressed Shh.⁶⁶

After 48 h in culture at 37°C in a 5% CO₂-in-air incubator, CD34⁺ cells were harvested and processed for proliferative assays, viability analysis, and flow cytometry stainings.

Proliferation assays. Cultures were pulsed for 12 h with 10 μM 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU). A specific kit from Roche Diagnostics (Barcelona, Spain), BrdU Labeling and Detection Kit III, was used to measure BrdU incorporation into newly synthesized DNA. Briefly, the labeling medium was removed, and cells were dried (2 h at 60°C), fixed in ethanol in HCl (0.5 M) for 30 min at -20°C, treated with nucleases (30 min at 37°C), and then incubated with peroxidase-conjugated Fab fragments of mouse anti-BrdU (30 min at 37°C). The peroxidase reaction was developed with ABTS substrate, and the sample absorbance was measured using an ELISA reader (ELX800MB, Bio-Tek Instruments, VT) at 405 nm with a reference wavelength at 492 nm.

Apoptosis assays. CD34⁺ cells were washed twice with PBS containing 1% FCS and then stained with Annexin V-FITC (BD Biosciences, San Jose, CA) according to the supplier's instructions. Cells were analyzed on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences; Centro de Microscopía y Citometría, Complutense University, Madrid, Spain) and gated according to

forward scatter, side scatter and their ability to exclude propidium iodide. Apoptotic cells were considered to be those that were Annexin V positive and propidium iodide negative.

Chimeric human-mouse fetal thymic organ cultures (FTOC). CB-17 SCID mice were purchased from Harlan Iberica (Barcelona, Spain) and maintained in our own pathogen-free breeding facility. Fetal mice were obtained by timed mating and the day of finding a vaginal plug was designated day 0 of pregnancy. Thymic lobes derived from 15-day-old embryos of SCID mice were seeded with human CD34⁺ thymic progenitors (1–2 x 10⁴ cells/lobe) using the hanging drop method for 48 hours, followed by culture of the recolonized lobes in FTOC as described previously.⁶⁷ Cultures were supplemented with rhBMP4 (100 ng/ml) and/or rhIL-7 (1,000 U/ml) throughout the culture period. Medium was replaced every week.

ELISA assays for BMP4 production. CD34⁺ cells were isolated and cultured in AIMV medium with or without rhShh for 12 h. Human thymic epithelial cells were isolated from thymus samples as previously described,⁴⁴ and cultured in RPMI 1640 supplemented with 5% FCS (Invitrogen) in the presence or absence of IL-7 for 2 days. Culture supernatants were collected and BMP4 levels were measured using an ELISA kit from R&D Systems.

Flow cytometry. The following mAb conjugated with FITC, PE, Cychrome or APC were used for flow cytometric analysis: CD4 (SK3), CD8 (SK1), CD34 (8G12 and Qbend/10), CD45 (HI30), and CD127 (R34.34 and HIL7R-M21) from BD Biosciences, Beckman Coulter (Marseille, France) and Chemicon (Temecula, CA). The extracellular domains of BMP and Hh receptors were detected with PE-conjugated anti-BMPRIA (E-16), anti-BMPRIIB (N-17), anti-Smo (N-19) antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), FITC-conjugated anti-BMPRIA antibodies (R&D Systems), and unconjugated anti-ActRIA antibodies (R&D Systems), followed by fluorochrome-conjugated, multiadsorbed F(ab')₂ fragments of donkey

anti-goat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories; West Grove, PA). Two-, three- and four-color immunofluorescence stainings were performed by incubating the cells in PBS containing 1% FCS and 0.1% NaN₃ in the presence of saturating amounts of fluorochrome-conjugated antibodies for 30 min at 4°C. For the intracellular stainings of phosphorylated STAT5 and phosphorylated Smad1, and according to the manufacturer's instructions, cells were treated with Cytofix/Cytoperm solution (BD Biosciences) for 20 min at 4°C, washed with Perm/Wash buffer (BD Biosciences), and stained with Alexa-Fluor 488-conjugated anti-human phospho-STAT5 (Tyr⁶⁹⁴) (BD Biosciences) or anti-human phospho-Smad1 (Ser⁴⁶³/Ser⁴⁶⁵) (Santa Cruz Biotechnology) followed by fluorochrome-conjugated, multiadsorbed F(ab')₂ fragments of donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories), all diluted in Perm/Wash buffer. Analyses were conducted in a FACSCalibur flow cytometer (Centro de Microscopía y Citometría, Complutense University of Madrid).

Statistical analysis. A Student's t test using a two-tailed p value was used to test the significance of differences between treatments. Values of p ≤ 0.05 (*), p ≤ 0.01 (**) and p ≤ 0.001 (***) were considered to be statistically significant.

Acknowledgements

This work was supported by grants BFU2006-00651 and BFU2007-65520 (Ministerio de Educación y Ciencia), RD06/0010/0003 (Instituto de Salud Carlos III), GR74/07-910552 (Universidad Complutense/Comunidad Autónoma de Madrid), and PR34/07-15867 (Universidad Complutense/Grupo Santander).

We thank Curis for providing human Shh protein and the Pediatric Cardiosurgery Units from Hospital Madrid-Montepríncipe and Hospital 12 de Octubre for the thymus samples.

References

- Kingsley DM. The TGFβ superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. *Genes Dev* 1994; 8:133-46.
- Ducy P, Karsenty G. The family of bone morphogenetic proteins. *Kidney Int* 2000; 57:2207-14.
- Kawabata M, Imamura T, Miyazono K. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998; 9:49-61.
- Balemans W, Van Hul W. Extracellular regulation of BMP signaling in vertebrates: a cocktail of modulators. *Dev Biol* 2002; 250:231-50.
- Gazzerro E, Minetti C. Potential drug targets within bone morphogenetic protein signaling pathways. *Curr Opin Pharmacol* 2007; 7:325-33.
- Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16:251-63.
- Zwijsen A, Verschueren K, Huylebroeck D. New intracellular components of bone morphogenetic protein/Smad signaling cascades. *FEBS Lett* 2003; 546:133-9.
- Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T, Miyazono K. Two major Smad pathways in TGFβ superfamily signalling. *Genes Cells* 2002; 7:1191-204.
- Hooper JE, Scott MP. Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6:306-17.
- Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev* 2001; 15:3059-87.
- Jeong J, McMahon AP. Cholesterol modification of Hedgehog family proteins. *J Clin Invest* 2002; 110:591-6.
- Lee JJ, Ekker SC, von Kessler DP, Porter JA, Sun BI, Beachy PA. Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis. *Science* 1994; 266:1528-37.
- Huangfu D, Anderson KV. Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from *Drosophila* to vertebrates. *Development* 2006; 133:3-14.
- Jia J, Jiang J. Decoding the Hedgehog signal in animal development. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63:1249-65.
- Ruiz i Altaba A, Mas C, Stecca B. The Gli code: an information nexus regulating cell fate, stemness and cancer. *Trends Cell Biol* 2007; 17:438-47.
- Ingham PW, Placzek M. Orchestrating ontogenesis: variations on a theme by sonic hedgehog. *Nat Rev Genet* 2006; 7:841-50.
- Kishigami S, Mishina Y. BMP signaling and early embryonic patterning. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16:265-78.
- Liu A, Niswander LA. Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6:945-54.
- McMahon AP, Ingham PW, Tabin CJ. Developmental roles and clinical significance of hedgehog signaling. *Curr Top Dev Biol* 2003; 53:1-114.
- Wu X, Shi W, Cao X. Multiplicity of BMP signaling in skeletal development. *Ann NY Acad Sci* 2007; 1116:29-49.
- Benson RA, Lowrey JA, Lamb JR, Howie SE. The Notch and Sonic hedgehog signalling pathways in immunity. *Mol Immunol* 2004; 41:715-25.
- Crompton T, Outram SV, Hager-Theodorides AL. Sonic hedgehog signalling in T-cell development and activation. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:726-35.
- Larsson J, Karlsson S. The role of Smad signaling in hematopoiesis. *Oncogene* 2005; 24:5676-92.
- Licona-Limon P, Soldevila G. The role of TGFβ superfamily during T cell development: new insights. *Immunol Lett* 2007; 109:1-12.
- Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, Baker DP, Williams KP, Chadwick K, et al. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol* 2001; 2:172-80.
- Bhatia M, Bonnet D, Wu D, Murdoch B, Wrana J, Gallacher L, Dick JE. Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 1999; 189:1139-48.
- Detmer K, Walker AN. Bone morphogenetic proteins act synergistically with haematopoietic cytokines in the differentiation of haematopoietic progenitors. *Cytokine* 2002; 17:36-42.

28. Grassinger J, Simon M, Mueller G, Drewel D, Andressen R, Hennemann B. Bone morphogenetic protein (BMP)-7 but not BMP-2 and BMP-4 improves maintenance of primitive peripheral blood-derived hematopoietic progenitor cells (HPC) cultured in serum-free medium supplemented with early acting cytokines. *Cytokine* 2007; 40:165-71.
29. Graf D, Nethisinghe S, Palmer DB, Fisher AG, Merkenschlager M. The developmentally regulated expression of Twisted gastrulation reveals a role for bone morphogenetic proteins in the control of T cell development. *J Exp Med* 2002; 196:163-71.
30. Hager-Theodorides AL, Outram SV, Shah DK, Sacedon R, Shrimpton RE, Vicente A, et al. Bone morphogenetic protein 2/4 signaling regulates early thymocyte differentiation. *J Immunol* 2002; 169:5496-504.
31. Tsai PT, Lee RA, Wu H. BMP4 acts upstream of FGF in modulating thymic stroma and regulating thymopoiesis. *Blood* 2003; 102:3947-53.
32. Varas A, Hager-Theodorides AL, Sacedon R, Vicente A, Zapata AG, Crompton T. The role of morphogens in T-cell development. *Trends Immunol* 2003; 24:197-206.
33. El Andaloussi A, Graves S, Meng F, Mandal M, Mashayekhi M, Aifantis I. Hedgehog signaling controls thymocyte progenitor homeostasis and differentiation in the thymus. *Nat Immunol* 2006; 7:418-26.
34. Hager-Theodorides AL, Dessens JT, Outram SV, Crompton T. The transcription factor Gli3 regulates differentiation of fetal CD4⁺ CD8⁺ double-negative thymocytes. *Blood* 2005; 106:1296-304.
35. Outram SV, Hager-Theodorides AL, Shah DK, Rowbotham NJ, Drakopoulou E, Ross SE, et al. Indian hedgehog (Ihh) both promotes and restricts thymocyte differentiation. *Blood* 2009; 113:2217-28.
36. Outram SV, Varas A, Pepicelli CV, Crompton T. Hedgehog signaling regulates differentiation from double-negative to double-positive thymocyte. *Immunity* 2000; 13:187-97.
37. Rowbotham NJ, Furmanski AL, Hager-Theodorides AL, Ross SE, Drakopoulou E, Koufalis C, et al. Repression of hedgehog signal transduction in T-lineage cells increases TCR-induced activation and proliferation. *Cell cycle* 2008; 7:904-8.
38. Rowbotham NJ, Hager-Theodorides AL, Furmanski AL, Crompton T. A novel role for Hedgehog in T-cell receptor signaling: implications for development and immunity. *Cell cycle* 2007; 6:2138-42.
39. Rowbotham NJ, Hager-Theodorides AL, Furmanski AL, Ross SE, Outram SV, Dessens JT, Crompton T. Sonic hedgehog negatively regulates pre-TCR induced differentiation by a Gli2 dependent mechanism. *Blood* 2009.
40. Shah DK, Hager-Theodorides AL, Outram SV, Ross SE, Varas A, Crompton T. Reduced thymocyte development in sonic hedgehog knockout embryos. *J Immunol* 2004; 172:2296-306.
41. Uhmman A, Dittmann K, Nitzki F, Dressel R, Koleva M, Frommhold A, et al. The Hedgehog receptor Patched controls lymphoid lineage commitment. *Blood* 2007; 110:1814-23.
42. Sacedon R, Varas A, Hernandez-Lopez C, Gutierrez-deFrias C, Crompton T, Zapata AG, Vicente A. Expression of hedgehog proteins in the human thymus. *J Histochem Cytochem* 2003; 51:1557-66.
43. Varas A, Hernandez-Lopez C, Valencia J, Mattavelli S, Martinez VG, Hidalgo L, et al. Survival and function of human thymic dendritic cells are dependent on autocrine Hedgehog signaling. *J Leukoc Biol* 2008; 83:1476-83.
44. Gutierrez-Frias C, Sacedon R, Hernandez-Lopez C, Cejalvo T, Crompton T, Zapata AG, et al. Sonic hedgehog regulates early human thymocyte differentiation by counteracting the IL-7-induced development of CD34⁺ precursor cells. *J Immunol* 2004; 173:5046-53.
45. Cejalvo T, Sacedon R, Hernandez-Lopez C, Diez B, Gutierrez-Frias C, Valencia J, et al. Bone morphogenetic protein-2/4 signalling pathway components are expressed in the human thymus and inhibit early T-cell development. *Immunology* 2007; 121:94-104.
46. Kretschmar M, Liu F, Hata A, Doody J, Massague J. The TGFbeta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev* 1997; 11:984-95.
47. Napolitano LA, Stoddart CA, Hanley MB, Wieder E, McCune JM. Effects of IL-7 on early human thymocyte progenitor cells in vitro and in SCID-hu Thy/Liv mice. *J Immunol* 2003; 171:645-54.
48. Okamoto Y, Douek DC, McFarland RD, Koup RA. Effects of exogenous interleukin-7 on human thymus function. *Blood* 2002; 99:2851-8.
49. Pallard C, Stegmann AP, van Kleffens T, Smart F, Venkitaraman A, Spits H. Distinct roles of the phosphatidylinositol 3-kinase and STAT5 pathways in IL-7-mediated development of human thymocyte precursors. *Immunity* 1999; 10:525-35.
50. Plum J, De Smedt M, Leclercq G, Verhasselt B, Vandekerckhove B. Interleukin-7 is a critical growth factor in early human T-cell development. *Blood* 1996; 88:4239-45.
51. Drossopoulou G, Lewis KE, Sanz-Ezquerro JJ, Nikbakht N, McMahon AP, Hoffmann C, Tickle C. A model for anteroposterior patterning of the vertebrate limb based on sequential long- and short-range Shh signalling and Bmp signalling. *Development* 2000; 127:1337-48.
52. Laufer E, Nelson CE, Johnson RL, Morgan BA, Tabin C. Sonic hedgehog and Fgf-4 act through a signaling cascade and feedback loop to integrate growth and patterning of the developing limb bud. *Cell* 1994; 79:993-1003.
53. Roberts DJ, Johnson RL, Burke AC, Nelson CE, Morgan BA, Tabin C. Sonic hedgehog is an endodermal signal inducing Bmp-4 and Hox genes during induction and regionalization of the chick hindgut. *Development* 1995; 121:3163-74.
54. Zhang Z, Song Y, Zhao X, Zhang X, Fermin C, Chen Y. Rescue of cleft palate in *Msx1*-deficient mice by transgenic *Bmp4* reveals a network of BMP and Shh signaling in the regulation of mammalian palatogenesis. *Development* 2002; 129:4135-46.
55. Ishizuya-Oka A, Hasebe T. Sonic hedgehog and bone morphogenetic protein-4 signaling pathway involved in epithelial cell renewal along the radial axis of the intestine. *Digestion* 2008; 77:42-7.
56. van Dop WA, Uhmman A, Wijgerde M, Sleddens-Linkels E, Heijmans J, Offerhaus GJ, et al. Depletion of the colonic epithelial precursor cell compartment upon conditional activation of the Hedgehog pathway. *Gastroenterology* 2009; 136:2195-203.
57. Wagner TU. Bone morphogenetic protein signaling in stem cells—one signal, many consequences. *Febs J* 2007; 274:2968-76.
58. Zhang J, Li L. BMP signaling and stem cell regulation. *Dev Biol* 2005; 284:1-11.
59. Kobielak K, Stokes N, de la Cruz J, Polak L, Fuchs E. Loss of a quiescent niche but not follicle stem cells in the absence of bone morphogenetic protein signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:10063-8.
60. Zhang J, He XC, Tong WG, Johnson T, Wiedemann LM, Mishina Y, et al. Bone morphogenetic protein signaling inhibits hair follicle anagen induction by restricting epithelial stem/progenitor cell activation and expansion. *Stem Cells* 2006; 24:2826-39.
61. Ahmed N, Sammons J, Carson RJ, Khokher MA, Hassan HT. Effect of bone morphogenetic protein-6 on haemopoietic stem cells and cytokine production in normal human bone marrow stroma. *Cell Biol Int* 2001; 25:429-35.
62. Rifas L. T-cell cytokine induction of BMP-2 regulates human mesenchymal stromal cell differentiation and mineralization. *J Cell Biochem* 2006; 98:706-14.
63. Fukui N, Zhu Y, Maloney WJ, Clohisy J, Sandell LJ. Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNFalpha in normal and osteoarthritic chondrocytes. *J Bone Joint Surg Am* 2003; 85:59-66.
64. Namba A, Aida Y, Suzuki N, Watanabe Y, Kawato T, Motohashi M, et al. Effects of IL-6 and soluble IL-6 receptor on the expression of cartilage matrix proteins in human chondrocytes. *Connect Tissue Res* 2007; 48:263-70.
65. Singhatanadgit W, Salih V, Olsen I. Bone morphogenetic protein receptors and bone morphogenetic protein signaling are controlled by tumor necrosis factor-alpha in human bone cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38:1794-807.
66. Pepinsky RB, Zeng C, Wen D, Rayhorn P, Baker DP, Williams KP, et al. Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic hedgehog. *J Biol Chem* 1998; 273:14037-45.
67. Hernandez-Lopez C, Varas A, Sacedon R, Jimenez E, Munoz JJ, Zapata AG, Vicente A. Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for early human T-cell development. *Blood* 2002; 99:546-54.



CXCL12/CXCR4 signaling promotes human thymic dendritic cell survival regulating the Bcl-2/Bax ratio

Carmen Hernández-López^a, Jaris Valencia^a, Laura Hidalgo^a, Víctor G. Martínez^a, Agustín G. Zapata^b, Rosa Sacedón^a, Alberto Varas^a, Angeles Vicente^{a,*}

^a Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Complutense University, Avenida Complutense s/n, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain

^b Department of Cell Biology, Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 April 2008

Received in revised form 30 June 2008

Accepted 7 July 2008

Available online 8 August 2008

Keywords:

Human thymus

Thymic dendritic cells

CXCL12

Survival

ABSTRACT

CXCL12, a member of the chemokine CXC subfamily, and its physiologic receptor CXCR4 are essential for the development of various organs during embryonic development and are also involved in the control of cell survival, proliferation and migration in adult tissues. In the human thymus, CXCL12 is produced by epithelial cells located in the subcapsular and medullary regions and CXCR4 is expressed in different thymocyte subpopulations. Several results have demonstrated that CXCL12/CXCR4 signaling participates in different intrathymic processes including the control of human precursor cell survival and proliferation, and the exit of mature thymocytes to the periphery. In this study, we show that CXCL12 is also produced by human thymic dendritic cells (DCs), most of which express CXCR4 receptor. The addition of exogenous CXCL12 significantly inhibited the serum depletion-induced apoptosis in thymic DCs, and the treatment with neutralizing antibodies against CXCL12 or CXCR4 decreased their survival. The survival-promoting effect of CXCL12 was mediated by the up-regulation of Bcl-2 protein expression and the concomitant down-regulation of Bax protein expression. The higher viability of thymic DCs also enhanced their allostimulatory capacity. Taken together, the results suggest a new function of CXCL12 in the human thymus controlling the survival and functionality of thymic DCs.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

CXCL12 (stromal cell-derived factor 1/SDF-1) is a CXC chemokine constitutively expressed by most tissues, in contrast to the majority of the other chemokines that are usually induced by pro-inflammatory cytokines [1,2]. Two isoforms, SDF-1 α and SDF-1 β , are generated from the CXCL12/SDF-1 gene by alternative splicing, and SDF-1 α represents the predominant isoform [3,4]. CXCL12 was initially identified as a pre-B cell growth factor and was later demonstrated to play critical roles in organogenesis as well as homing/mobilization, survival, proliferation and activation of different types of normal and malignant cells [1,5–10]. CXCR4, the receptor for CXCL12, is a G-protein-coupled 7-transmembrane receptor that also functions as a coreceptor for the entry of T-tropic strains of human immunodeficiency virus 1 into CD4⁺ cells [11–13].

Accumulating evidence suggests that CXCL12 and its receptor CXCR4 may play an important role in intrathymic T-cell differentiation in both humans and mice: CXCL12 mRNA and protein

are abundantly expressed in fetal and adult thymus [14–19]; CXCR4 is highly expressed on intrathymic progenitor cells and to a lesser extent on immature CD4⁺ CD8[−] and CD4⁺ CD8⁺ thymocytes [15–17,20]; CXCL12 functions as a chemotactic factor to direct the migration of early thymic precursor cells from the cortico-medullary border to the cortex [16], as well as the movement of immature CD4⁺ CD8⁺ through the thymic cortical area [21], and also functions as a fugetactic factor to regulate mature thymocyte emigration to periphery [22,23]; CXCL12/CXCR4 signaling is required for the survival of human CD34⁺ intrathymic precursor cells and partially mediates the effects of IL-7 on the expansion and differentiation of human early thymocytes [15]; the blockade of CXCL12/CXCR4 signaling pathway, using different mutant and chimeric mice, results in reduced numbers of thymocytes and an arrest in thymocyte maturation [16,24–26]. However, nothing has been reported about a possible role for CXCL12/CXCR4 signaling in the function of thymic dendritic cells (DCs). Thymic DCs are professional antigen-presenting cells that are mostly located in the cortico-medullary border and the medulla [27,28]. Their main function is to present self-antigens and induce negative selection of potential auto-reactive T-cell clones [29,30]. We report in this study that thymic DCs express CXCR4 and produce CXCL12. In addition,

* Corresponding author. Tel.: +34 91 3947166; fax: +34 91 3941396.
E-mail address: avicente@bio.ucm.es (A. Vicente).

we show that CXCL12 promotes the survival of thymic DCs regulating the balance between the anti-apoptotic protein Bcl-2 and the pro-apoptotic protein Bax.

2. Materials and methods

2.1. Isolation of human thymic dendritic cells

Thymus samples from 1-month to 5-year-old children ($n=20$) undergoing corrective cardiac surgery were obtained and used according to the guidelines of the Medical Ethics Commission of Madrid-Monte Príncipe and 12 de Octubre Hospitals (Madrid, Spain). Informed consent was provided according to the Declaration of Helsinki. Thymuses were dissected free of surrounding connective tissue and then gently disrupted with a potter homogenizer until completely disaggregated. Thymic cell suspensions were firstly depleted of CD2⁺ thymocytes by using the sheep red blood cell rosetting technique [31], and the recovered cells were then depleted of T, B, myeloid and NK cells and thymic progenitors by treatment with anti-CD3, anti-CD7, anti-CD19, anti-CD14, anti-CD34 and anti-CD56 (all from BD Biosciences, San Jose, CA) bound to sheep anti-mouse Ig-coated magnetic beads (Dynal, Oslo, Norway), as previously described [32]. The purity of the recovered DCs was greater than 95%.

2.2. Histology and immunofluorescence

As previously described [15,33], thymic cryosections (7 μ m thick) were air-dried for 2 h at room temperature and fixed in acetone for 10 min, and cytopsin preparations of thymic DCs were fixed in acetone for 5 min at -20°C . Nonspecific binding of antibodies was blocked by incubation with diluted donkey serum (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and avidin-biotin (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Sections and cytopsin were then sequentially incubated with anti-human CXCL12/SDF-1 α antibodies (R&D Systems, Minneapolis, MN), biotinylated donkey anti-goat IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA), Texas red-conjugated streptavidin (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, United Kingdom), and anti-human medullary/subcapsular thymic epithelial cells (TE-4; kindly provided by Dr. B.F. Haynes, Duke University, Medical Center, Durham, NC) in the case of thymic cryosections, or anti-human HLA-DR (BD Biosciences, San José, CA) in the case of cytopsin, followed by FITC-conjugated human adsorbed F(ab')₂ fragments of rabbit anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Slides were mounted in Vectashield (Vector Laboratories) and then examined using a Zeiss Axioplan-2 microscope (Centro de Microscopía y Citometría, Complutense University of Madrid).

2.3. RT-PCR analysis

RNA isolation was performed using a Strataprep Total RNA Miniprep Kit (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA), including a Dnase I digestion step, as recommended by the supplier, to avoid genomic DNA contamination. Total cDNA was synthesized with Superscript II RT polymerase (Invitrogen, Grand Island, NY), according to the instructions of the commercial supplier, and then used as target in the PCR amplifications. Amplifications were performed using specific primer sets previously described [34]. All PCR reactions were performed on a Mastercycler gradient machine (Eppendorf, Hamburg, Germany) using AmpliTaqGold DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA) under the following conditions: 3 min at 94°C , 40 cycles of 45 s at 94°C , 45 s of each particular T annealing and, 45 s at 72°C , followed by 10 min at 72°C .

PCR products were resolved on a 2% agarose gel and the measured sizes were as expected.

2.4. Culture of isolated thymic DCs

Purified thymic DCs (1×10^5) were cultured in 96-well flat-bottom culture plates in 0.2 ml of AIMV serum-free medium (Invitrogen) in the absence or presence of recombinant human CXCL12/SDF-1 α (2.5–10 ng/ml), neutralizing mouse anti-human CXCR4 antibodies (10 μ g/ml), neutralizing goat anti-human CXCL12/SDF-1 α antibodies (10 μ g/ml) or recombinant human CD40 ligand (CD40L; 10 μ g/ml) (all from R&D Systems, Minneapolis, MN). After different periods of culture at 37°C in a 5% CO₂-in-air incubator, cells were harvested, counted and processed for viability analysis and flow cytometry stainings.

2.5. Flow cytometry

The following mAbs conjugated with FITC, PE or Cychrome were used for flow cytometric analysis: CD40 (5C3), CD80 (BB1), CD86 (2331), CD184/CXCR4 (12G5), HLA-DR (G46-6) from BD Biosciences, and CD54 (15.2) from Southern Biotechnology Associates (Birmingham, AL). Immunofluorescence stainings were performed by incubating the cells in PBS containing 1% FCS and 0.1% NaN₃ in the presence of saturating amounts of fluorochrome-conjugated Abs for 30 min at 4°C . For the intracellular stainings, and according to the manufacturer's instructions, cells were treated with Cytofix/Cytoperm solution (BD Biosciences) for 20 min at 4°C , washed with Perm/Wash buffer (BD Biosciences), and stained with PE-conjugated anti-human Bcl-2 mAb (BD Biosciences), anti-human Bcl-X_L mAb, anti-human Bim mAb (both from Chemicon, Temecula, CA), anti-human Bax Ab (BD Biosciences) and anti-human CXCL12/SDF-1 α Ab (R&D Systems), followed by FITC- or PE-conjugated multi-adsorbed F(ab')₂ fragments of donkey anti-mouse, anti-rat, anti-rabbit or anti-goat IgG, respectively, all of them diluted in Perm/Wash buffer. Cell viability was estimated by propidium iodide staining. Analyses were conducted in a FAC-SCalibur flow cytometer (BD Biosciences) and a three laser BD LSR flow cytometer (BD Biosciences) from the Centro de Microscopía y Citometría, Complutense University of Madrid.

2.6. MLR assays

Thymic DCs were used at different numbers as stimulators for resting allogeneic T cells (2×10^5) isolated from peripheral blood. The cultures were performed in 96-well flat-bottom culture plates, using 0.2 ml of AIMV supplemented with 2% human serum. After 3 days at 37°C in a 5% CO₂-in-air incubator, the cultures were pulsed for 12 h with 10 μ M 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU). A specific kit from Roche Diagnostics (Barcelona, Spain), BrdU Labeling and Detection Kit III, was used to measure BrdU incorporation into newly synthesized DNA. Briefly, the labeling medium was removed, and cells were dried (2 h at 60°C), fixed in ethanol in HCl (0.5 M) for 30 min at -20°C , treated with nucleases (30 min at 37°C), and then incubated with peroxidase-conjugated Fab fragments of mouse anti-BrdU (30 min at 37°C). The peroxidase reaction was developed with ABTS substrate, and the sample absorbance was measured using an ELISA reader (ELX800MB, Bio-Tek Instruments, VT) at 405 nm with a reference wavelength at 492 nm.

2.7. DC-T cell conjugates

Control and CXCL12 pre-treated DCs were cultured for 24 and 48 h in the absence of rhCXCL12, stained with CFSE (Invitrogen) and mixed with allogeneic T cells previously stained with PKH26

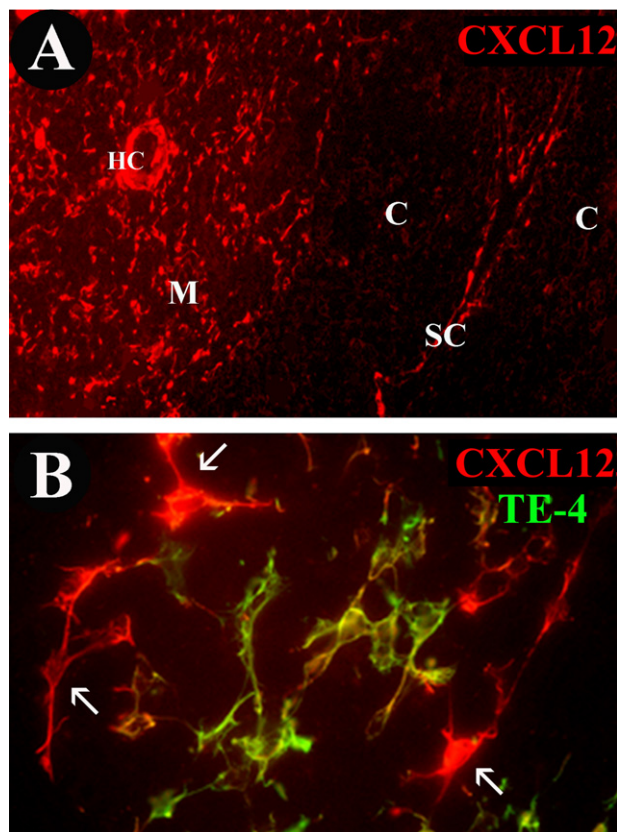


Fig. 1. Expression of CXCL12 in the human thymus. Frozen sections of human thymus were double stained with anti-CXCL12/SDF-1 α antibodies (red fluorescence; A and B) in combination with anti-TE-4 antibodies recognizing human subcapsular and medullary thymic epithelial cells (green fluorescence; B). In the thymic medulla, CXCL12 expression is detected in both TE-4-positive epithelial cells (yellow cells) and TE-4-negative cells (arrows) exhibiting a dendritic cell morphology (B). Original magnifications: 50 \times (A); 250 \times (B); SC, subcapsular area; C: cortex; M: medulla; HC: Hassall's corpuscle. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

(Sigma España, Spain). DCs and T cells were mixed at a ratio of 1:5, spun at 500 rpm for 5 min to facilitate cell–cell contact and cultured for 30 min at 37 $^{\circ}$ C. Next, weak conjugates were dislodged by mild vortexing and the proportion of DC/T cell conjugates was analyzed by flow cytometry.

3. Results

3.1. Expression of CXCL12 and its receptor CXCR4 in human thymic dendritic cells

Previous reports have described in the human thymus that CXCL12 expression is restricted to the thymic subcapsula and medulla [15,19], and that CXCL12-expressing cells mainly correspond to thymic epithelial cells, as demonstrated by double immunofluorescence stainings using specific cell markers for subcapsular and medullary thymic epithelial cells [15]. However, in the thymic medullary regions it also appeared scattered cells with a dendritic morphology that strongly expressed CXCL12 protein and did not react with anti-thymic epithelial cell mAbs (Fig. 1). To investigate whether those cells corresponded to thymic DCs expressing CXCL12, this thymic cell population was isolated and the expression of RNAs encoding CXCL12 was assessed by RT-PCR. As shown in Fig. 2A, specific transcripts for CXCL12 were detected in purified thymic DCs confirming their capacity to produce CXCL12. The intra-

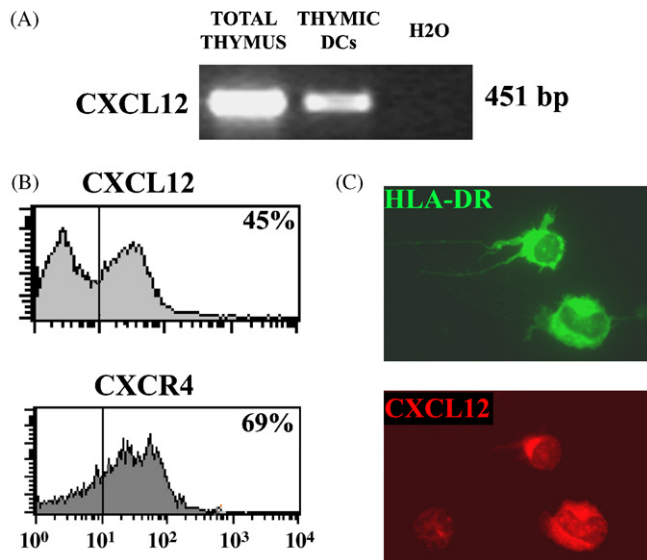


Fig. 2. Expression of CXCL12 and CXCR4 in human thymic dendritic cells. (A) RT-PCR analysis of the expression of CXCL12 on total thymus and purified thymic DCs. Band size is indicated. H₂O served as negative control. (B) Histograms show the cytoplasmic expression of CXCL12 protein as well as the surface expression of CXCR4 on thymic DCs. The percentages of positive cells are indicated in each histogram. Background fluorescence values were set by the use of isotype-matched irrelevant mAbs. (C) Human thymic DCs were isolated, cytopun onto slides and stained with anti-CXCL12/SDF-1 α and HLA-DR antibodies. Micrographs demonstrate the cytoplasmic expression of CXCL12 in thymic DCs identified by their morphology and HLA-DR expression. Results shown are representative of three to nine independent experiments.

cytoplasmic expression of CXCL12 protein was further analyzed by flow cytometry (Fig. 2B) and by immunofluorescence on cytopspin preparations (Fig. 2C), demonstrating in both cases that the proportion of SDF-producing DCs was about 30–50%. The cell surface expression of CXCR4 was also analyzed by flow cytometry, showing that a high proportion (\approx 70%) of thymic DCs expressed the receptor for CXCL12 (Fig. 2B).

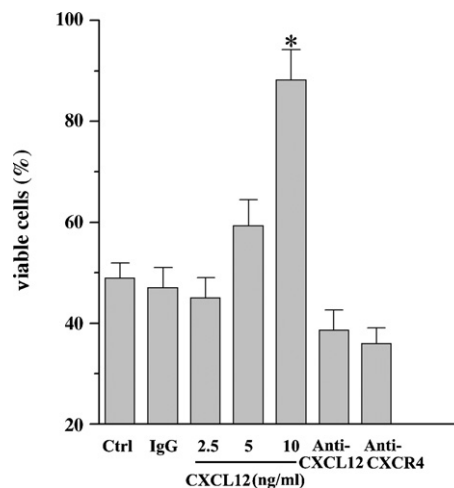


Fig. 3. CXCL12 enhances the survival of human thymic dendritic cells. Determination of thymic DC viability after culture in serum-free medium alone or supplemented with either different doses of rhCXCL12 or neutralizing antibodies against CXCR4 receptor (10 μ g/ml) or CXCL12 protein (10 μ g/ml). Number of input cells, 10^5 . After 24 h, cells were recovered, counted, and stained with propidium iodide. Data represent the mean (\pm S.D.) of five independent experiments, including three cultures per point (* $P \leq 0.05$, by t-test).

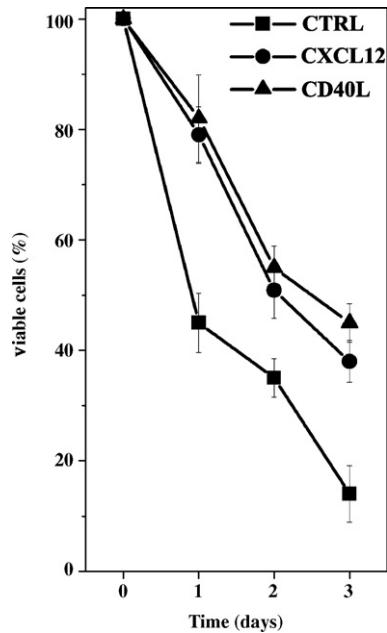


Fig. 4. CXCL12 is a dendritic cell survival factor. Thymic DCs were cultured for several days in the absence or presence of rhCXCL12 (10 ng/ml) or CD40L (10 µg/ml). Cell viability was assessed daily by propidium iodide staining. Data represent the mean (\pm S.D.) of three to five independent experiments.

3.2. CXCL12 enhances the survival of human thymic DCs

To determine the functional relevance of CXCL12/CXCR4 signaling in human thymic DCs, experiments were performed in which thymic DCs were cultured for 24 h in serum-free medium with different doses of rhCXCL12, and cellular viability was evaluated. The presence of rhCXCL12 increased the recovery of thymic DCs in a dose-responsive manner, with a maximal effect at a concentration of 10 ng/ml which induced a twofold increase in viability (Fig. 3). On the contrary, the addition of neutralizing antibodies against human CXCR4 receptor or human CXCL12 protein induced moderate decrease in the cell recovery from DC cultures (Fig. 3).

Thymic DCs were next cultured in the presence of the highest dose of rhCXCL12 for several periods of time. Fig. 4 shows that the viability of thymic DCs cultured in the absence of rhCXCL12 diminished progressively, and by day 3 a high proportion of DCs were dead. In contrast, the addition of rhCXCL12 significantly inhibited DC apoptosis during the whole culture period, being the highest effect detected on day 3 (Fig. 4). Remarkably, the SDF-dependent anti-apoptotic effects were comparable to those induced by the lig-

ation of CD40, a potent survival stimulus for dendritic cells (Fig. 4) [35–39].

To gain insight into the molecular mechanisms by which CXCL12 inhibits the serum depletion-induced apoptosis in thymic DCs, we examined in untreated and SDF-treated thymic DC suspensions the expression of different Bcl-2 family proteins, known to control DC survival [36,40–42]. The presence of rhCXCL12 induced a significant up-regulation of Bcl-2 expression (1.5–2.5 times in percentage of positive cells and 1.5–2 times in mean fluorescence intensity) and, concomitantly, an important down-regulation of Bax expression (2–2.5 times in percentage of positive cells and 1.5–2 times in mean fluorescence intensity) (Fig. 5). Therefore, the treatment of thymic DCs with rhCXCL12 induced a drastic increase in the Bcl-2/Bax ratio (untreated DCs: 0.8; SDF-treated DCs: 3.5), which correlated with the higher survival of thymic DCs in SDF-treated cultures. On the contrary, the expression of the anti-apoptotic Bcl-X_L protein and the pro-apoptotic Bim protein was not significantly affected by the presence of rhCXCL12 (Fig. 5).

3.3. CXCL12 effects on thymic DC allostimulatory capacity

To evaluate the capacity of CXCL12 to affect DC functionality, thymic DCs were pre-treated overnight with rhCXCL12 and equivalent numbers of viable CXCL12-treated or untreated thymic DCs were used in a MLR. Exogenous rhCXCL12 was not added during the whole culture period to avoid the effects on responding T cells. The MLR assays revealed that CXCL12-treated DCs were able to induce a higher T cell proliferative response (Fig. 6A). The ability of control and CXCL12-treated DCs to form tight conjugates with T cells was also examined, and we showed that the proportion of conjugated DCs was higher at 48 h (C: 6.2 ± 1.3 ; CXCL12: 13.1 ± 1.1), but not at 24 h (C: 19 ± 2.9 ; CXCL12: 23 ± 5.6) after CXCL12 pre-treatment. The analysis of the surface expression of HLA-DR, CD40, CD80, CD86 and CD54 molecules showed that there were no significant differences when untreated and CXCL12-treated thymic DCs were compared (Fig. 6B). No changes were detected in the production of pro-inflammatory cytokines, such as IL-12 (data not shown). Then, these results indicate that the higher capacity of CXCL12-treated DCs to stimulate T cell proliferation would be attributed to the survival-promoting effect of CXCL12.

4. Discussion

In the present study we show that in the human thymus, apart from the subcapsular and medullary thymic epithelial cells, thymic DCs are also able to produce CXCL12. In addition, thymic DCs mostly express its receptor CXCR4, indicating that CXCL12/CXCR4 axis may influence DC functionality. In agreement with our findings, Schmitt

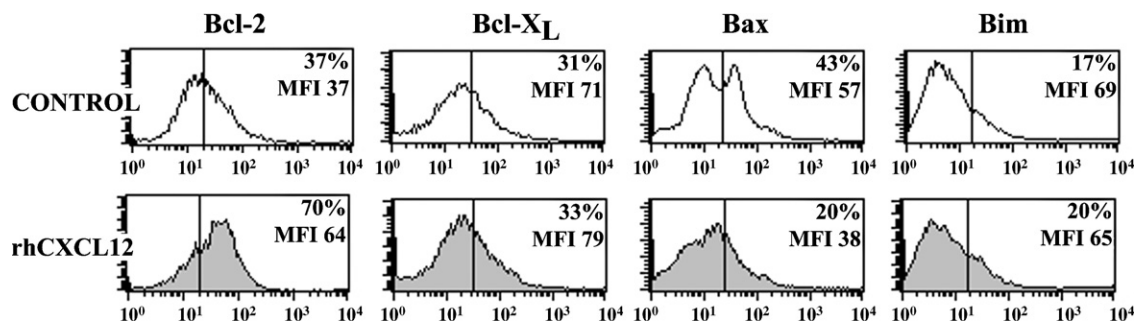


Fig. 5. CXCL12 regulates the Bcl-2/Bax ratio in human thymic dendritic cells. The expression of Bcl-2, Bcl-X_L, Bax and Bim proteins was determined by flow cytometry in untreated and SDF-treated thymic DCs. Dashed lines represent background staining. The percentages of positive cells and the mean fluorescence intensities are indicated in the histograms. Data are representative results from three independent experiments.

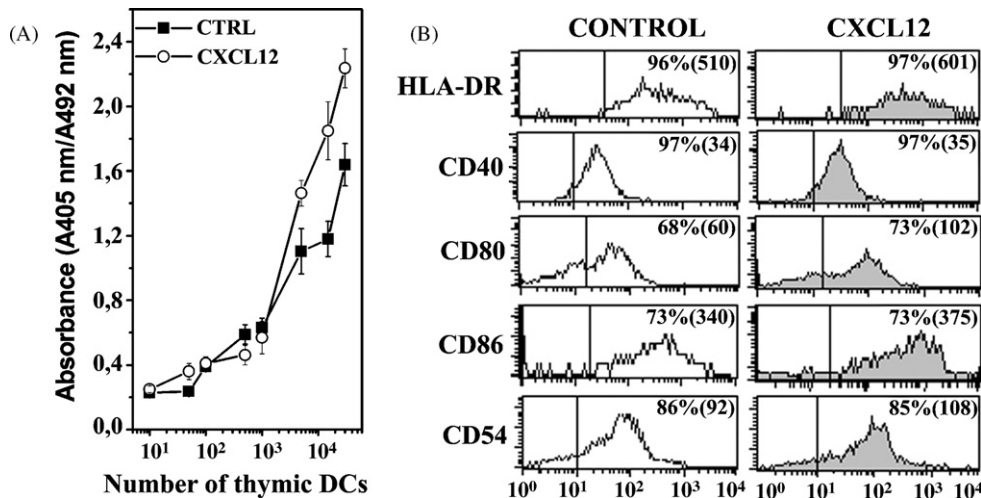


Fig. 6. T-cell stimulatory function of SDF-treated thymic dendritic cells. (A) Thymic DCs were cultured overnight in the presence or absence of rhCXCL12 and used at different numbers as stimulators for resting allogeneic T cells. After 3 days, the cultures were pulsed with BrdU for 12 h. A specific kit was used to measure BrdU incorporation into newly synthesized DNA. Results are the means (\pm S.D.) of the pooled data from three experiments, each with three cultures per point. (B) The expression of HLA-DR, CD40, CD80, CD86 and CD54 was analyzed by flow cytometry in untreated and SDF-treated thymic DCs used for the MLR assays. The percentages of positive cells (and mean fluorescence intensities) are indicated in the histograms.

et al. [43] have recently reported that CXCR4-tropic viruses efficiently replicated in thymic DCs. Likewise, CXCR4 expression have been described in several types of peripheral DCs [19,44–47] and Pablos et al. [48] have demonstrated that skin and lymph node DCs produce CXCL12. Nevertheless, the fact that not all thymic DCs produce CXCL12 or express CXCR4 suggest that thymic DC subpopulations may exhibit a selective usage of chemokine receptors and a differential migration behaviour, correlated to their different functions, as has been reported for myeloid and plasmacytoid dendritic cells from human peripheral blood [49–51].

In the human thymus, CXCL12 seems to exert pleiotropic effects regulating critical processes in thymocyte development such as the survival and the IL-7-mediated expansion and subsequent differentiation of CD34⁺ precursor cells [15], the elimination of apoptotic thymocytes [19], the movement of some populations of immature CD4⁺CD8⁺ thymocytes in the cortex [21], and the emigration of mature thymocytes from the thymus as a result of a fugetactic migratory response to CXCL12 [22]. Our current data show a new function for CXCL12 controlling the survival of human thymic DCs, since the addition of rhCXCL12 notably protects them from serum depletion-induced apoptosis, whereas the blockade of CXCL12/CXCR4 signaling reduces DC viability. CXCL12 has also been reported to function as a survival factor for different cell types, including T cells [52,53], neurons [54,55], osteoclasts [56], hematopoietic progenitor cells [8,15,57,58], embryonic stem cells [59] and tumour cells [6,60,61]. We also investigated the effects of CXCL12 on the expression of those Bcl-2 family proteins reported to regulate DC survival [36,40–42]. Our results indicate that the survival-promoting effects of CXCL12 involves an increase in the Bcl-2/Bax ratio due to both the up-regulation of anti-apoptotic Bcl-2 protein and the down-regulation of pro-apoptotic Bax protein. In accordance with these results, the modulation of the CXCL12/CXCR4 signaling has been demonstrated to be able to induce changes in the Bcl-2/Bax ratio in human T cell lines, intrathymic CD34⁺ cells and granulosa cells [15,62,63]. In contrast, the expression of Bcl-X_L and Bim proteins in human thymic DCs does not appear to be altered by the treatment with CXCL12. Wright et al. [56] described, however, an up-regulation of Bcl-X_L and a down-regulation of Bim after the addition of CXCL12 to cultures of human osteoclasts, a cell type that has been described to express

little or no Bcl-2, and whose Bax levels are not affected by CXCL12 [56].

The factors that control the survival, and consequently the longevity of thymic DCs remain poorly analyzed, and to our knowledge only Vasilijic et al. [64] have shown that GM-CSF, presumably produced by thymic epithelial cells [65], could function as an anti-apoptotic factor for DCs in rat thymus. We extend this finding and demonstrate that CXCL12 regulates human thymic DC viability by an autocrine/paracrine mechanism, and could therefore function as a survival factor during the lifespan of thymic DCs. The increase in DC viability involves an enhancement of their functionality, as demonstrated by others [39,42] and also by our results with MLR and DC/T cell conjugation assays. Then, in the future, it would be interesting to investigate whether CXCL12 may also enhance the survival of peripheral DCs, what could increase their efficacy when used as vaccines.

Besides these physiological functions, the secretion of CXCL12 by thymic DCs could also play a role in pathological situations, such as HIV infection. In these circumstances, CXCL12 production would represent an antiviral mechanism that could increase the survival of thymic DCs, which are directly infected due to the expression of CD4 and CXCR4 and die after infection [43], and/or could delay the propagation of X4 HIV strains by inducing the down-regulation of CXCR4 in neighboring thymocytes [48].

Acknowledgements

This work was supported by grants BFU2006-00651 and BFU2007-65520 from the Ministerio de Educación y Ciencia, RD06/0010/0003 from the Instituto de Salud Carlos III, and GR74/07-910552 from the Universidad Complutense y Comunidad Autónoma de Madrid. We thank the Pediatric Cardiosurgery Units from Hospital Madrid-Montepríncipe and Hospital 12 de Octubre for the thymus samples.

References

- [1] Nagasawa T, Tachibana K, Kishimoto T. A novel CXC chemokine PBSF/SDF-1 and its receptor CXCR4: their functions in development, hematopoiesis and HIV infection. *Semin Immunol* 1998;10:179–85.

- [2] Ponomarev T, Peled A, Petit I, Taichman RS, Habler L, Sandbank J, et al. Induction of the chemokine stromal-derived factor-1 following DNA damage improves human stem cell function. *J Clin Invest* 2000;106:1331–9.
- [3] Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, et al. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 1995;28:495–500.
- [4] Tashiro K, Tada H, Heikler R, Shirozu M, Nakano T, Honjo T. Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 1993;261:600–3.
- [5] Arya M, Ahmed H, Silhi N, Williamson M, Patel HR. Clinical importance and therapeutic implications of the pivotal CXCL12–CXCR4 (chemokine ligand–receptor) interaction in cancer cell migration. *Tumour Biol* 2007;28:123–31.
- [6] Juarez J, Bendall L. SDF-1 and CXCR4 in normal and malignant hematopoiesis. *Histol Histopathol* 2004;19:299–309.
- [7] Kucia M, Reza R, Miekus K, Wanzeck J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, et al. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1–CXCR4 axis. *Stem Cells* 2005;23:879–94.
- [8] Lataillade JJ, Domenech J, Le Bousse-Kerdiles MC. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCR4 couple plays multiple roles on haematopoietic progenitors at the border between the old cytokine and new chemokine worlds: survival, cell cycling and trafficking. *Eur Cytokine Netw* 2004;15:177–88.
- [9] Nanki T, Lipsky PE. Cutting edge: stromal cell-derived factor-1 is a costimulator for CD4⁺ T cell activation. *J Immunol* 2000;164:5010–4.
- [10] Ratajczak MZ, Zuba-Surma E, Kucia M, Reza R, Wojakowski W, Ratajczak J. The pleiotropic effects of the SDF-1–CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia* 2006;20:1915–24.
- [11] Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, et al. The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996;382:829–33.
- [12] Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996;272:872–7.
- [13] Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, et al. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 1996;382:833–5.
- [14] Bleul CC, Boehm T. Chemokines define distinct microenvironments in the developing thymus. *Eur J Immunol* 2000;30:3371–9.
- [15] Hernandez-Lopez C, Varas A, Sacedon R, Jimenez E, Munoz JJ, Zapata AG, et al. Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for early human T-cell development. *Blood* 2002;99:546–54.
- [16] Plotkin J, Prockop SE, Lepique A, Petrie HT. Critical role for CXCR4 signaling in progenitor localization and T cell differentiation in the postnatal thymus. *J Immunol* 2003;171:4521–7.
- [17] Suzuki G, Sawa H, Kobayashi Y, Nakata Y, Nakagawa K, Uzawa A, et al. Pertussis toxin-sensitive signal controls the trafficking of thymocytes across the corticomedullary junction in the thymus. *J Immunol* 1999;162:5981–5.
- [18] Wilkinson B, Owen JJ, Jenkinson EJ. Factors regulating stem cell recruitment to the fetal thymus. *J Immunol* 1999;162:3873–81.
- [19] Zaitseva M, Kawamura T, Loomis R, Goldstein H, Blauvelt A, Golding H. Stromal-derived factor 1 expression in the human thymus. *J Immunol* 2002;168:2609–17.
- [20] Zaitseva MB, Lee S, Rabin RL, Tiffany HL, Farber JM, Peden KW, et al. CXCR4 and CCR5 on human thymocytes: biological function and role in HIV-1 infection. *J Immunol* 1998;161:3103–13.
- [21] Swainson L, Kinet S, Manel N, Battini JL, Sitbon M, Taylor N. Glucose transporter 1 expression identifies a population of cycling CD4⁺ CD8⁺ human thymocytes with high CXCR4-induced chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:12867–72.
- [22] Poznansky MC, Olszak IT, Evans RH, Wang Z, Foxall RB, Olson DP, et al. Thymocyte emigration is mediated by active movement away from stroma-derived factors. *J Clin Invest* 2002;109:1101–10.
- [23] Vianello F, Kraft P, Mok YT, Hart WK, White N, Poznansky MC. A CXCR4-dependent chemorepellent signal contributes to the emigration of mature single-positive CD4 cells from the fetal thymus. *J Immunol* 2005;175:5115–25.
- [24] Ara T, Itoi M, Kawabata K, Egawa T, Tokoyoda K, Sugiyama T, et al. A role of CXC chemokine ligand 12/stromal cell-derived factor-1/pre-B cell growth stimulating factor and its receptor CXCR4 in fetal and adult T cell development in vivo. *J Immunol* 2003;170:4649–55.
- [25] Kawabata K, Ujikawa M, Egawa T, Kawamoto H, Tachibana K, Iizasa H, et al. A cell-autonomous requirement for CXCR4 in long-term lymphoid and myeloid reconstitution. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:5663–7.
- [26] Onai N, Zhang Y, Yoneyama H, Kitamura T, Ishikawa S, Matsushima K. Impairment of lymphopoiesis and myelopoiesis in mice reconstituted with bone marrow-hematopoietic progenitor cells expressing SDF-1-intracrine. *Blood* 2000;96:2074–80.
- [27] Ardavin C. Thymic dendritic cells. *Immunol Today* 1997;18:350–61.
- [28] Evans VA, Cameron PU, Lewin SR. Human thymic dendritic cells: regulators of T cell development in health and HIV-1 infection. *Clin Immunol* 2008;126:1–12.
- [29] Gallegos AM, Bevan MJ. Central tolerance: good but imperfect. *Immunol Rev* 2006;209:290–6.
- [30] Wu L, Shortman K. Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Semin Immunol* 2005;17:304–12.
- [31] Beaulieu S, Landry D, Bergeron D, Cohen EA, Montplaisir S. An improved method for purifying human thymic dendritic cells. *J Immunol Methods* 1995;180:225–36.
- [32] Varas A, Jimenez E, Sacedon R, Rodriguez-Mahou M, Maroto E, Zapata AG, et al. Analysis of the human neonatal thymus: evidence for a transient thymic involution. *J Immunol* 2000;164:6260–7.
- [33] Sacedon R, Vicente A, Varas A, Jimenez E, Munoz JJ, Zapata AG. Glucocorticoid-mediated regulation of thymic dendritic cell function. *Int Immunol* 1999;11:1217–24.
- [34] Aiuti A, Turchetto L, Cota M, Cipponi A, Brambilla A, Arcelloni C, et al. Human CD34⁺ cells express CXCR4 and its ligand stromal cell-derived factor-1. Implications for infection by T-cell tropic human immunodeficiency virus. *Blood* 1999;94:62–73.
- [35] Björck P, Banchereau J, Flores-Romo L. CD40 ligation counteracts Fas-induced apoptosis of human dendritic cells. *Int Immunol* 1997;9:365–72.
- [36] Hou WS, Van Parijs L. A Bcl-2-dependent molecular timer regulates the lifespan and immunogenicity of dendritic cells. *Nat Immunol* 2004;5:583–9.
- [37] Miga AJ, Masters SR, Durell BG, Gonzalez M, Jenkins MK, Maliszewski C, et al. Dendritic cell longevity and T cell persistence is controlled by CD154–CD40 interactions. *Eur J Immunol* 2001;31:959–65.
- [38] Pirtskhalaishvili G, Shurin GV, Esche C, Cai Q, Salup RR, Bykovskaia SN, et al. Cytokine-mediated protection of human dendritic cells from prostate cancer-induced apoptosis is regulated by the Bcl-2 family of proteins. *Br J Cancer* 2000;83:506–13.
- [39] Wong BR, Josien R, Lee SY, Sauter B, Li HL, Steinman RM, et al. TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med* 1997;186:2075–80.
- [40] Chen M, Huang L, Shabier Z, Wang J. Regulation of the lifespan in dendritic cell subsets. *Mol Immunol* 2007;44:2558–65.
- [41] Hon H, Rucker III EB, Hennighausen L, Jacob J. Bcl-x_L is critical for dendritic cell survival in vivo. *J Immunol* 2004;173:4425–32.
- [42] Nopora A, Brocker T. Bcl-2 controls dendritic cell longevity in vivo. *J Immunol* 2002;169:3006–14.
- [43] Schmitt N, Nugeyre MT, Scott-Algara D, Cumont MC, Barre-Sinoussi F, Pancino G, et al. Differential susceptibility of human thymic dendritic cell subsets to X4 and R5 HIV-1 infection. *Aids* 2006;20:533–42.
- [44] Almeida M, Cordero M, Almeida J, Orfao A. Different subsets of peripheral blood dendritic cells show distinct phenotypic and functional abnormalities in HIV-1 infection. *Aids* 2005;19:261–71.
- [45] Ayeunie S, Garcia-Zepeda EA, Hoxie JA, Horuk R, Kupper TS, Luster AD, et al. Human immunodeficiency virus-1 entry into purified blood dendritic cells through CC and CXC chemokine coreceptors. *Blood* 1997;90:1379–86.
- [46] Sozzani S, Luini W, Borsatti A, Polentarutti N, Zhou D, Piemonti L, et al. Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines. *J Immunol* 1997;159:1993–2000.
- [47] Zaitseva M, Blauvelt A, Lee S, Lapham CK, Klaus-Kovtun V, Mostowski H, et al. Expression and function of CCR5 and CXCR4 on human Langerhans cells and macrophages: implications for HIV primary infection. *Nat Med* 1997;3:1369–75.
- [48] Pablos JL, Amara A, Boulloc A, Santiago B, Caruz A, Galindo M, et al. Stromal-cell derived factor is expressed by dendritic cells and endothelium in human skin. *Am J Pathol* 1999;155:1577–86.
- [49] Penna G, Sozzani S, Adorini L. Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 2001;167:1862–6.
- [50] Penna G, Vulcano M, Sozzani S, Adorini L. Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol* 2002;63:1164–71.
- [51] Vanbervliet B, Bendriss-Vermare N, Massacrier C, Homey B, de Bouteiller O, Briere F, et al. The inducible CXCR3 ligands control plasmacytoid dendritic cell responsiveness to the constitutive chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)/CXCL12. *J Exp Med* 2003;198:823–30.
- [52] Pajusto M, Ihalainen N, Pelkonen J, Tarkkanen J, Mattila PS. Human in vivo-activated CD45RO⁺ CD4⁺ T cells are susceptible to spontaneous apoptosis that can be inhibited by the chemokine CXCL12 and IL-2, -6, -7, and -15. *Eur J Immunol* 2004;34:2771–80.
- [53] Suzuki Y, Rahman M, Mitsuya H. Diverse transcriptional response of CD4⁺ T cells to stromal cell-derived factor (SDF)-1: cell survival promotion and priming effects of SDF-1 on CD4⁺ T cells. *J Immunol* 2001;167:3064–73.
- [54] Chalasani SH, Baribaud F, Coughlan CM, Sunshine MJ, Lee VM, Doms RW, et al. The chemokine stromal cell-derived factor-1 promotes the survival of embryonic retinal ganglion cells. *J Neurosci* 2003;23:4601–12.
- [55] Khan MZ, Brandimarti R, Musser BJ, Resue DM, Fatatis A, Meucci O. The chemokine receptor CXCR4 regulates cell-cycle proteins in neurons. *J Neurovirol* 2003;9:300–14.
- [56] Wright LM, Maloney W, Yu X, Kindel L, Collin-Osdoby P, Osdoby P. Stromal cell-derived factor-1 binding to its chemokine receptor CXCR4 on precursor cells promotes the chemotactic recruitment, development and survival of human osteoclasts. *Bone* 2005;36:840–53.
- [57] Broxmeyer HE, Kohli L, Kim CH, Lee Y, Mantel C, Cooper S, et al. Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 directly enhances survival/antiapoptosis of myeloid progenitor cells through CXCR4 and Gai proteins and enhances engraftment of competitive, repopulating stem cells. *J Leukoc Biol* 2003;73:630–8.

- [58] Lee Y, Gotoh A, Kwon HJ, You M, Kohli L, Mantel C, et al. Enhancement of intracellular signaling associated with hematopoietic progenitor cell survival in response to SDF-1/CXCL12 in synergy with other cytokines. *Blood* 2002;99:4307–17.
- [59] Guo Y, Hangoc G, Bian H, Pelus LM, Broxmeyer HE. SDF-1/CXCL12 enhances survival and chemotaxis of murine embryonic stem cells and production of primitive and definitive hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells* 2005;23:1324–32.
- [60] Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 2006;107:1761–7.
- [61] Dewan MZ, Ahmed S, Iwasaki Y, Ohba K, Toi M, Yamamoto N. Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer. *Biomed Pharmacother* 2006;60:273–6.
- [62] Kryczek I, Frydman N, Gaudin F, Krzysiek R, Fanchin R, Emilie D, et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 contributes to T lymphocyte recruitment in human pre-ovulatory follicles and coordinates with lymphocytes to increase granulosa cell survival and embryo quality. *Am J Reprod Immunol* 2005;54:270–83.
- [63] Yang WB, Kong PY, Chang C, Wei L, Zeng DF, Peng XG, et al. Effects of RNA interference inhibiting SDF-1 expression in bone marrow stromal cells on the proliferation and apoptosis of co-cultured Jurkat cells. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* 2005;26:421–4.
- [64] Vasilijic S, Colic M, Vucevic D. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor is an anti-apoptotic cytokine for thymic dendritic cells and a significant modulator of their accessory function. *Immunol Lett* 2003;86:99–112.
- [65] Le PT, Lazorick S, Whichard LP, Yang YC, Clark SC, Haynes BF, et al. Human thymic epithelial cells produce IL-6, granulocyte-monocyte-CSF, and leukemia inhibitory factor. *J Immunol* 1990;145:3310–5.

Survival and function of human thymic dendritic cells are dependent on autocrine Hedgehog signaling

Alberto Varas,^{*,1} Carmen Hernández-López,^{*} Jaris Valencia,^{*} Silvia Mattavelli,[†] Victor G. Martínez,^{*} Laura Hidalgo,^{*} Cruz Gutiérrez-Frías,^{*} Agustín G. Zapata,[†] Rosa Sacedón,^{*} and Angeles Vicente^{*}

Department of Cell Biology, Faculties of ^{*}Medicine and [†]Biology, Complutense University, Madrid, Spain

Abstract: The Hedgehog (Hh) family of signaling molecules functions in the development of numerous tissues during embryogenesis and has also been involved in adult self-renewing tissues. Recent results have demonstrated that the different components of the Hh signaling pathway are expressed in the human thymus. In this study, we investigate whether thymic dendritic cells (DCs) are cell targets for Hh signaling. Both components of the Hh receptor, Patched and Smoothened, as well as other Hh-binding proteins with modulating functions, are expressed by human thymic DCs. The expression of Gli1, Gli2, and Gli3 transcription factors suggests that the Hh signaling pathway is active in thymic DCs, and approximately one-half of thymic DCs produces Sonic Hh (Shh). The culture of thymic DCs with Shh protects them from apoptosis [similarly to CD40 ligand (CD40L)], and these antiapoptotic effects are related to an up-regulation of Bcl-2 and Bcl-X_L protein expression. The addition of the Hh pathway inhibitor, cyclopamine, decreases DC viability and impairs their allostimulatory function in vitro. In addition, the blockade of the Hh signaling pathway by cyclopamine treatment abrogates the up-regulation of HLA-DR, CD86, CD80, and CD83 expression induced by CD40L on thymic DCs. Finally, we also show that after activation with CD40L thymic DCs down-regulate the expression of Hh receptor components as well as Shh production. Taken together, these results suggest that the survival and function of thymic DCs are regulated by an autocrine Hh signaling. *J. Leukoc. Biol.* 83: 1476–1483; 2008.

Key Words: thymus · cyclopamine · Patched · Smoothened

INTRODUCTION

The Hedgehog (Hh) signaling pathway plays critical roles in vertebrate and invertebrate embryogenesis, determining cell fate and patterning during the development of many organs, as well as regulating survival and proliferation of a number of different cell types [1, 2]. The importance of this pathway is emphasized by the fact that mutations leading to an aberrant

Hh pathway can result in severe developmental defects and cancers in humans [3–6]. In mammals, three proteins have been described to compose the Hh family: Sonic (Shh), Indian (Ihh), and Desert Hh (Dhh), and Shh is the best studied [1, 7]. Hh proteins undergo extensive post-translational modifications before being secreted, and Hh signaling is initiated by binding of Hh proteins to the 12-span transmembrane receptor Patched (Ptc), which in the absence of ligand, represses signaling by inhibiting the seven-transmembrane protein Smoothened (Smo). Upon ligand binding, the repressive activity of Ptc is abrogated, allowing Smo to transduce the signal toward the nucleus by a complex mechanism [7–9]. At the end of the Hh signaling pathway are the members of the Gli family of transcription factors, Gli1, Gli2, and Gli3. The specific functions of the Gli proteins are still poorly understood, although all of the activities demonstrated for Gli1 are positive, whereas Gli2 and Gli3 mainly function as positive and negative transcriptional regulators, respectively [10–12].

The different components of the Hh signaling pathway have been described to be expressed in the thymus [13–15] and to play an important role regulating the proliferation and differentiation of thymocyte precursors [13, 14, 16–19]. In humans, the three mammalian Hh proteins are produced by thymic epithelial cells. Shh-producing epithelial cells are restricted to the thymic subcapsula and medulla, and Ihh- and Dhh-expressing epithelial cells appear distributed throughout the thymic parenchyma. The requisite Hh receptors, Ptc and Smo, are expressed mainly by immature thymocytes and also by thymic epithelial cells located in the cortex and medulla. The Gli transcription factors are differentially expressed by the different thymic cell subpopulations [15]. The culture of CD34⁺ T cell precursors in the presence of recombinant Shh protein induces their survival. It also inhibits their IL-7-mediated proliferation and differentiation by down-regulating CD127/IL-7R expression and inhibiting IL-7-dependent STAT5 phosphorylation, indicating that Shh contributes to maintain the intrathymic progenitor cell population [17]. How-

¹ Correspondence: Department of Cell Biology, Faculty of Medicine, Avda. Complutense s/n, Ciudad Universitaria, Complutense University, 28040 Madrid, Spain. E-mail: avaras@bio.ucm.es

Received November 26, 2007; revised January 24, 2008; accepted February 13, 2008.

doi: 10.1189/jlb.1107792

ever, nothing has been described about the expression of the Hh signaling pathway components on human thymic dendritic cells (DCs) or about a possible role for Hh signaling in thymic DC function. Thymic DCs are specialized APCs, mainly localized in the medulla and corticomedullary junction, which are able to present self-antigens to developing thymocytes and play a pivotal role in thymocyte-negative selection and central tolerance induction [20–22]. We report in this study that thymic DCs express all the molecular machinery required to respond to Hh proteins. In addition, we show that thymic DCs produce Shh, which functions autocrinally to regulate their survival and functionality.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of human thymic DCs

Human thymus samples from patients, aged 1 month to 5 years, undergoing corrective cardiac surgery, were obtained and used according to the guidelines of the Medical Ethics Commission of La Zarzuela and Madrid-Monte Príncipe Hospitals (Madrid, Spain). Informed consent was provided according to the Declaration of Helsinki. Thymuses were dissected free of surrounding connective tissue and then gently disrupted with a potter homogenizer until completely disaggregated. Thymic cell suspensions were first depleted of CD2⁺ thymocytes by using the SRBC rosetting technique, and the recovered cells were then depleted of T, B, myeloid, and NK cells and thymic progenitors by treatment with anti-CD3, anti-CD7, anti-CD19, anti-CD14, anti-CD34, and anti-CD56 (all from BD Biosciences, San Jose, CA, USA) bound to sheep anti-mouse, Ig-coated magnetic beads (Dynal, Oslo, Norway), as described previously [23]. The purity of the recovered DCs was greater than 95%, and the cell surface phenotype of the resulting DC population is shown in **Figure 1A**.

RT-PCR analysis

RNA isolation was performed using a Strataprep Total RNA Miniprep kit (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, USA), including a DNase I digestion step, as recommended by the supplier, to avoid genomic DNA contamination. Total cDNA was synthesized with Superscript II RT polymerase (Invitrogen, Grand Island, NY, USA), according to the instructions of the commercial supplier, and then used as a target in the PCR amplifications, which were performed using specific primer sets described previously [15, 24]. All PCR reactions were performed on a Mastercycler gradient machine (Eppendorf, Hamburg, Germany) using AmpliTaqGold DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) under the following conditions: 3 min at 94°C, 40 cycles of 45 s at 94°C, 45 s of each particular T annealing, and 45 s at 72°C, followed by 10 min at 72°C. PCR products were resolved on a 2% agarose gel, and the measured sizes were as expected.

Culture of isolated thymic DCs

Purified thymic DCs (1×10^5) were cultured in 96-well flat-bottom culture plates in 0.2 ml AIM V serum-free medium (Invitrogen) in the absence or presence of cyclopamine (5 μ M), a cell-permeable inhibitor of the Hh signaling pathway (generously gifted by Dr. William Gaffield, Western Regional Research Center, Albany, CA, USA); tomatidine (5 μ M), a steroidal alkaloid that structurally resembles cyclopamine but lacks the capacity to inhibit Hh signaling (Calbiochem, Nottingham, UK); recombinant human CD40 ligand (CD40L; 10 μ g/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA); and modified recombinant human Shh (kindly provided by Curis, Cambridge, MA, USA; endotoxin level: <1 EU/mg Shh protein). This Shh protein was octylated for high activity. In vitro modification of N-Shh (aa 25–199), with a lipophilic group on the N-terminal cysteine, significantly increases the specific activity (>30-fold) of *Escherichia coli*-derived N-Shh as measured by activation of Hh signal transduction in cultured cells. Octyl N-Shh is a hydrophobically modified version of the Shh signaling protein generated by coupling N-octyl-maleimide to the N-terminal cysteine of bacterially derived N-Shh. This modification

represents a simple and efficient way to generate high, specific-activity Shh protein from bacterially expressed Shh [25]. After different periods of culture at 37°C in a 5% CO₂-in-air incubator, cells were harvested, counted, and processed for viability analysis and flow cytometry stainings.

MLR assays

Thymic DCs were used at different numbers (10 cells to 15×10^3 cells) as stimulators for resting allogeneic T cells (2×10^5) isolated from peripheral blood. The cultures were performed in 96-well flat-bottom culture plates, using 0.2 ml AIM V supplemented with 2% human serum. After 3 days at 37°C in a 5% CO₂-in-air incubator, the cultures were pulsed for 12 h with 10 μ M BrdU. A specific kit from Roche Diagnostics (Barcelona, Spain), BrdU Labeling and Detection Kit III, was used to measure BrdU incorporation into newly synthesized DNA. Briefly, the labeling medium was removed, and cells were dried (2 h at 60°C), fixed in ethanol in HCl (0.5 M) for 30 min at –20°C, treated with nucleases (30 min at 37°C), and then incubated with peroxidase-conjugated Fab fragments of mouse anti-BrdU (30 min at 37°C). The peroxidase reaction was developed with 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline sulphonic acid) substrate, and the sample absorbance was measured using an ELISA reader (ELX800MB, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA) at 405 nm with a reference wavelength at 492 nm.

Flow cytometry

The following mAb conjugated with FITC, PE, or Cychrome were used for flow cytometric analysis: CD4 (SK3), CD13 (R3-242), CD33 (WM53), CD40 (5C3), CD80 (BB1), CD86 (2331), and HLA-DR (G46-6) from BD Biosciences and CD83 (HB15A) from Coulter-Immunotech (Beckman-Coulter, Marseille, France). The extracellular domains of Hh receptors were detected with PE-conjugated anti-Smo (N-19) antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and anti-Ptc1 antibodies (Abcam, Cambridge, UK) followed by FITC- or PE-conjugated, multiadsorbed F(ab')₂ fragments of donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories; West Grove, PA, USA). Two- and three-color immunofluorescence stainings were performed by incubating the cells in PBS containing 1% FCS and 0.1% Na₂S₂O₃ in the presence of saturating amounts of fluorochrome-conjugated antibodies for 30 min at 4°C. For the intracellular stainings and according to the manufacturer's instructions, cells were treated with Cytofix/Cytoperm solution (BD Biosciences) for 20 min at 4°C, washed with Perm/Wash buffer (BD Biosciences), and stained with PE-conjugated anti-human Bcl-2 mAb (BD Biosciences), anti-human Bcl-X_L and anti-human Bim mAb (both from Chemicon, Temecula, CA, USA), and anti-Shh C-terminal peptide antibody (R&D Systems), followed by FITC- or PE-conjugated, multiadsorbed F(ab')₂ fragments of donkey anti-mouse, anti-rat, or anti-goat IgG, respectively—all of them diluted in Perm/Wash buffer. Cell viability was estimated by propidium iodide staining. Analyses were conducted in a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) and a three-laser BD LSR flow cytometer (BD Biosciences) from the Centro de Microscopía y Citometría, Complutense University (Madrid, Spain).

RESULTS

Expression of Hh signaling pathway components in human thymic DCs

To determine whether DCs are targets for Hh proteins in the human thymus, the cell surface expression of the Hh receptor components was analyzed by flow cytometry. As shown in **Figure 1B**, 40–60% of thymic DCs were positive for Ptc, the Hh-binding subunit, and 20–45% expressed Smo, the signaling component of the Hh receptor. Moreover, the majority of Smo-expressing DCs coexpressed Ptc in the plasma membrane (**Fig. 1B**).

The expression of Hh receptors was confirmed by RT-PCR, as Ptc- and Smo-encoding RNAs were detected in purified thymic DCs (**Fig. 1C**). Likewise, the thymic DC population

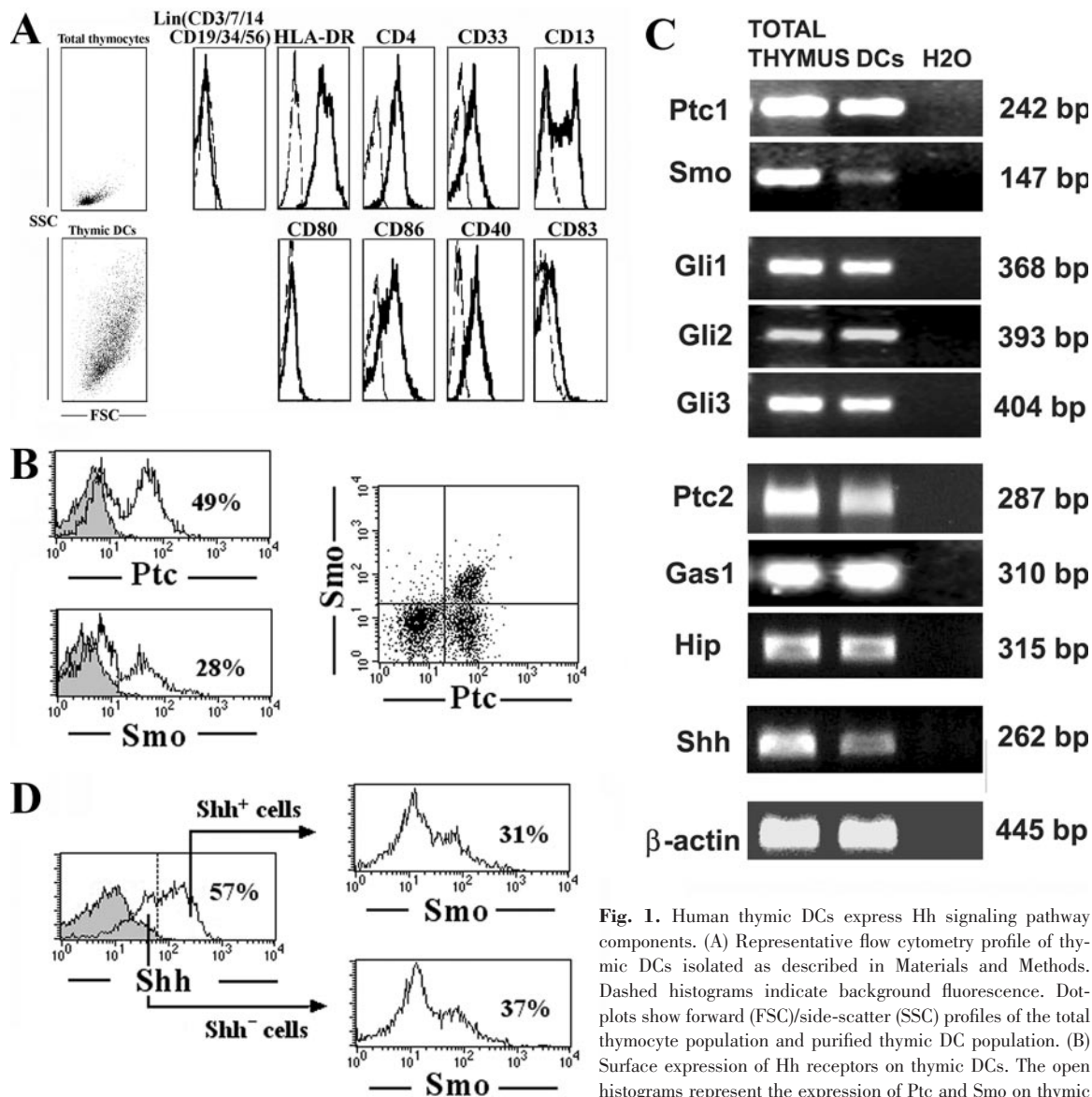


Fig. 1. Human thymic DCs express Hh signaling pathway components. (A) Representative flow cytometry profile of thymic DCs isolated as described in Materials and Methods. Dashed histograms indicate background fluorescence. Dot-plots show forward (FSC)/side-scatter (SSC) profiles of the total thymocyte population and purified thymic DC population. (B) Surface expression of Hh receptors on thymic DCs. The open histograms represent the expression of Ptc and Smo on thymic DCs, and solid histograms indicate background staining. The

percentages of positive cells are shown in each histogram. Dot-plot shows the correlated expression of Ptc and Smo on isolated thymic DCs. (C) RT-PCR analysis of the expression of different components of the Hh signaling pathway on total thymus and isolated thymic DCs. Band sizes are indicated. H₂O served as negative control. Gas1, Growth arrest-specific gene 1; Hip, Hh-interacting protein. (D) Open histograms show the cytoplasmic expression of the Shh protein on thymic DCs, as well as the surface expression of the Smo receptor of Shh-producing and nonproducing thymic DCs. The percentages of positive cells are indicated in each histogram. Data are representative of five to nine independent experiments.

expressed RNAs for Ptc2, a homologue of the Ptc receptor [26], and other Hh-binding proteins with modulating functions [27, 28], such as Hip and Gas1 (Fig. 1C). We also found that thymic DCs expressed specific RNAs for Gli1, Gli2, and Gli3 transcription factors (Fig. 1C), suggesting that the Hh signaling pathway is active in DCs from human thymus.

As Ptc2 expression seems to be associated with Hh-producing cells [29], we assessed the expression of RNAs encoding the mammalian Hh proteins and showed that Shh RNA transcripts were expressed in the thymus DC population (Fig. 1C). The intracytoplasmic expression of Shh protein was analyzed further by flow cytometry, demonstrating that the proportion of Shh-producing DCs was 50–60% (Fig. 1D). We could find no

correlation between Smo expression and Shh production in thymic DCs, as a similar percentage of Shh-producing and nonproducing DCs expressed the Smo receptor (Fig. 1D).

Shh is a thymic DC survival factor

The relevance of Hh signaling in thymic DCs was assessed further by culturing DCs in serum-free medium supplemented with Shh and evaluating the cell viability. After 24 h, DCs treated with different doses of Shh were always protected from spontaneous cell death compared with untreated cells (**Fig. 2A**). The viability of control thymic DCs progressively decreased in culture, and by Day 3, a high proportion of DCs was dead. In contrast, the presence of Shh significantly prevented

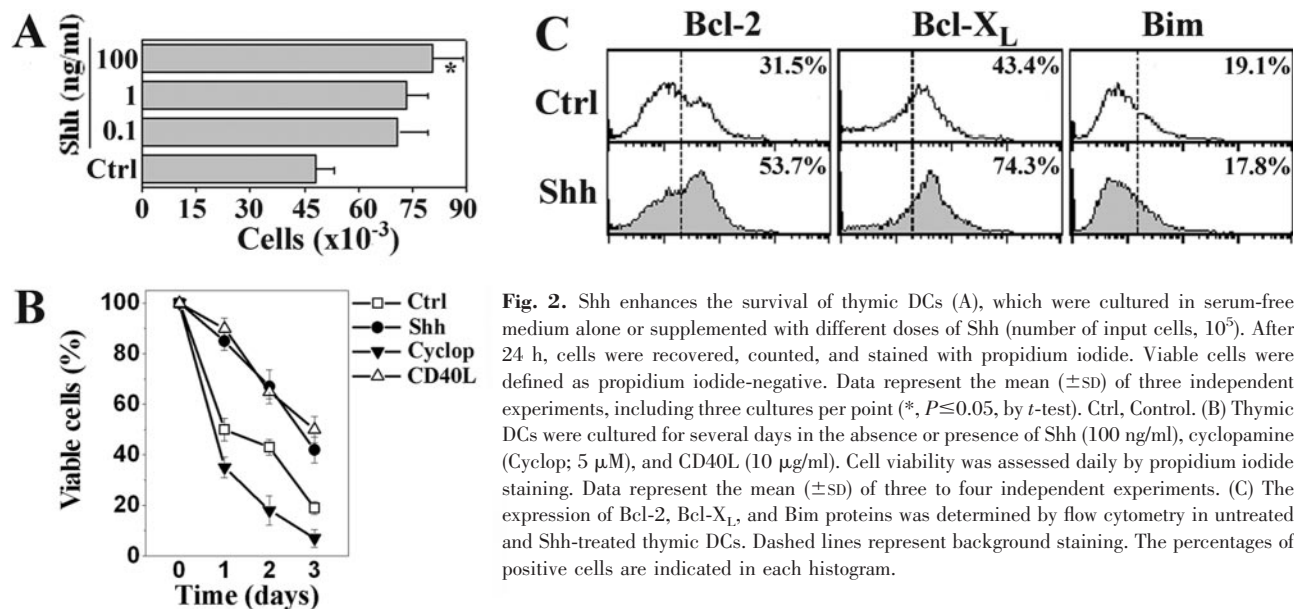


Fig. 2. Shh enhances the survival of thymic DCs (A), which were cultured in serum-free medium alone or supplemented with different doses of Shh (number of input cells, 10⁵). After 24 h, cells were recovered, counted, and stained with propidium iodide. Viable cells were defined as propidium iodide-negative. Data represent the mean (±SD) of three independent experiments, including three cultures per point (*, $P \leq 0.05$, by *t*-test). Ctrl, Control. (B) Thymic DCs were cultured for several days in the absence or presence of Shh (100 ng/ml), cyclopamine (Cyclop; 5 μ M), and CD40L (10 μ g/ml). Cell viability was assessed daily by propidium iodide staining. Data represent the mean (±SD) of three to four independent experiments. (C) The expression of Bcl-2, Bcl-X_L, and Bim proteins was determined by flow cytometry in untreated and Shh-treated thymic DCs. Dashed lines represent background staining. The percentages of positive cells are indicated in each histogram.

DC apoptosis during the whole culture period, being the highest effect detected on Day 3 (Fig. 2B). These antiapoptotic effects were comparable with those induced by CD40 ligation (Fig. 2B).

As thymic DCs produce Hh proteins and express Hh receptors, DCs were also treated with cyclopamine, a steroidal alkaloid that binds directly to Smo and induces a conformational shift leading to Smo inactivation and Hh signaling pathway inhibition [30]. The presence of cyclopamine decreased the proportion of viable DCs, and only ~10% of viable cells could be recovered after 3 days of culture. In comparison, the proportion of cell survival in control and Shh-treated cultures was two and six times higher, respectively (Fig. 2B).

It has been previously shown that Bcl-2 and Bcl-X_L expression is up-regulated in DCs after CD40 triggering, and this correlates to an increased cell survival [31–33]. To determine whether Shh-dependent stimulation of DC survival was also accompanied by an increased expression of Bcl-2 and Bcl-X_L, we analyzed by flow cytometry the expression of antiapoptotic proteins as well as the expression of the proapoptotic Bcl-2 family member Bim, also described to be involved in the regulation of DC survival [32]. We found that Shh treatment led to an up-regulation of Bcl-2 and Bcl-X_L protein expression (Fig. 2C). No change was seen in Bim expression (Fig. 2C). These results suggest that Shh, in addition to CD40L, influences thymic DC survival by regulating the expression levels of antiapoptotic Bcl-2 family members.

Inhibition of Hh signaling impairs thymic DC allostimulatory capacity

To evaluate the role of Hh proteins on DC functionality, we analyzed the effects of blocking endogenous Shh signaling in the allostimulatory capacity of DCs. Thymic DCs were pre-treated overnight with cyclopamine or the control steroidal alkaloid tomatidine, and equivalent numbers of viable cyclopamine- and tomatidine-treated or untreated DCs were used in

a MLR. The MLR assays revealed a strong suppression of allogeneic stimulatory function of cyclopamine-treated DCs. As shown in **Figure 3**, when 7.5×10^3 cyclopamine-treated DCs were added, proliferation was similar to that observed when only 1.8×10^3 tomatidine-treated or untreated control DCs were used as stimulatory cells.

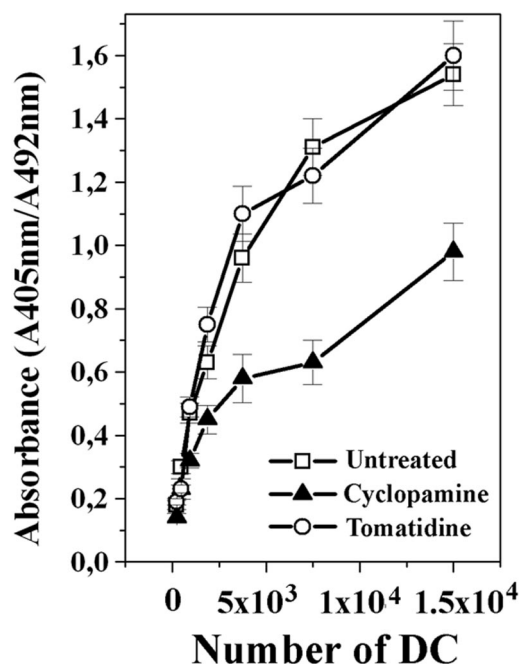


Fig. 3. T cell stimulatory function of cyclopamine-treated thymic DCs is strongly decreased. Thymic DCs were cultured overnight in the absence or presence of cyclopamine or the control steroidal alkaloid tomatidine and used at different numbers as stimulators for resting allogeneic T cells. After 3 days, the cultures were pulsed for 12 h with BrdU. A specific kit was used to measure BrdU incorporation into newly synthesized DNA. Full details are given in Materials and Methods. Results are the means (±SD) of the pooled data from five to seven experiments, each with three cultures per point.

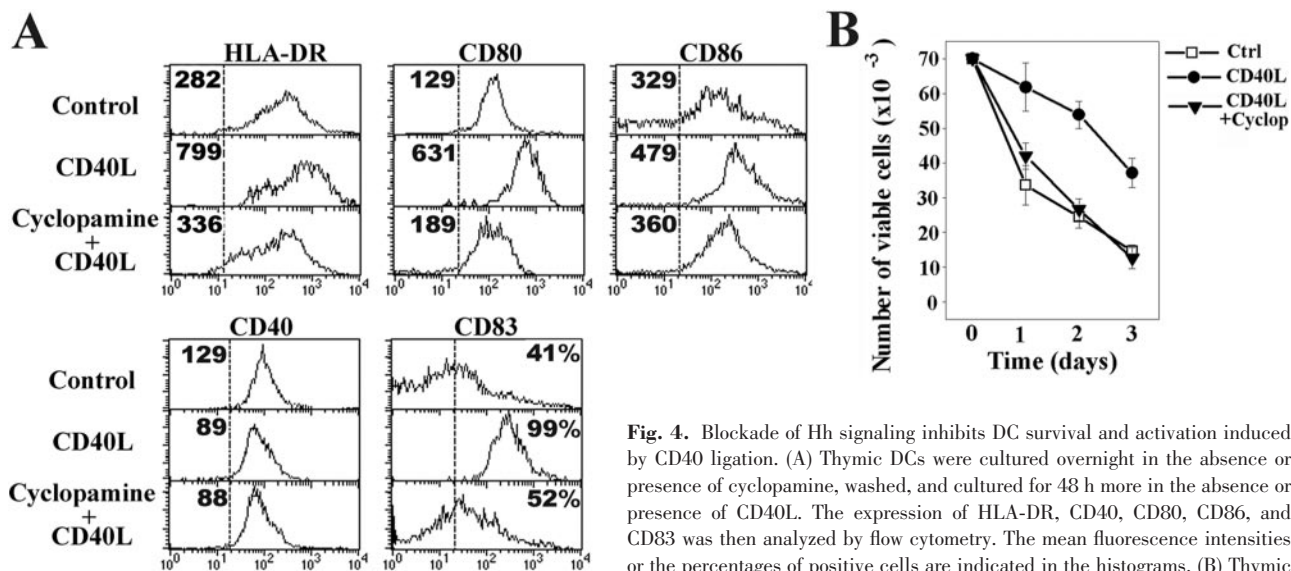


Fig. 4. Blockade of Hh signaling inhibits DC survival and activation induced by CD40 ligation. (A) Thymic DCs were cultured overnight in the absence or presence of cyclopamine, washed, and cultured for 48 h more in the absence or presence of CD40L. The expression of HLA-DR, CD40, CD80, CD86, and CD83 was then analyzed by flow cytometry. The mean fluorescence intensities or the percentages of positive cells are indicated in the histograms. (B) Thymic DCs were cultured for several days in the absence or presence of CD40L and

cyclopamine plus CD40L. Cell viability was assessed daily by propidium iodide staining. Data represent the mean (\pm SD) of two to three independent experiments.

Hh signaling blockade inhibits DC activation induced by CD40 ligation

Previous reports have pointed out that resting and activated peripheral T cells produce Shh [34, 35]. To avoid the possible effects of T cell-derived Shh on DC function when using MLR assays, we analyzed the effects of cyclopamine pretreatment on CD40-dependent DC activation. As expected, the addition of CD40L to control DC cultures induced a strong up-regulation of the expression levels of HLA-DR and the costimulatory molecules CD86 and CD80. In addition, all DCs acquired CD83 expression (**Fig. 4A**). Interestingly, the blockade of the Hh signaling pathway by cyclopamine pretreatment abrogated the up-regulation of HLA-DR, CD86, CD80, as well as CD83 expression induced by CD40L on thymic DCs (**Fig. 4A**). Likewise, cyclopamine also inhibited the survival-promoting effect of CD40L on thymic DCs (**Fig. 4B**). Therefore, these results suggest that thymic DC activation and survival are dependent on Shh signaling.

Activated DCs down-regulate Hh receptor expression and Shh production

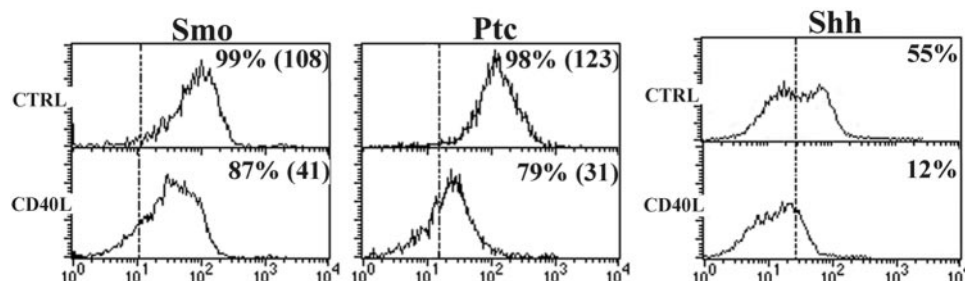
Finally, we analyzed whether the expression of the Hh receptor changes upon DC activation. Our data showed that stimulation by CD40L notably down-regulated the expression levels of the

Hh receptor components (**Fig. 5**). The proportion of Ptc-expressing DCs was also reduced after activation (**Fig. 5**). Likewise, when the cytoplasmic expression of Shh was assessed, we found that the proportion of Shh-producing thymic DCs decreased after CD40 ligation (**Fig. 5**), suggesting that Shh production is down-regulated in activated DCs.

DISCUSSION

The data presented in this paper further extend our investigation about the role of Hh proteins in the human thymus. Previously, we reported that the components of the Hh signaling pathway exhibit a complex intrathymic expression pattern involving thymic epithelial cells and thymocytes located in the different thymic compartments [15]. Likewise, we showed that Hh proteins function in the maintenance of intrathymic CD34⁺ precursor cell populations [17]. Here, we provide evidence that the activity of other key components of the thymus gland, the thymic DCs, is also regulated by the Hh signaling pathway. Thymic DCs express the two components of the Hh receptor, Ptc and Smo, as well as the three members of the Gli protein family. These transcription factors exhibit distinct, although overlapping, functions, and whereas Gli1 is exclusively a Hh-

Fig. 5. Down-regulation of the Hh signaling pathway in activated thymic DCs, which were cultured for 24 h in the absence or presence of CD40L, and then the surface expression of Ptc and Smo receptors and the intracellular expression of Shh were determined by flow cytometry. The percentages of positive cells and their mean fluorescence intensities are indicated in the histograms.



dependent activator of Hh targets, Gli2 and Gli3 may function as positive or negative regulators of transcription, although Gli2 acts primarily as a transcriptional activator, and Gli3 functions mainly as a repressor [10, 11]. In addition, thymic DCs express Ptc2, which seems to have functions related but also distinct from its homologue Ptc [36, 37]. These findings suggest the occurrence of complex Hh signaling responses in thymic DCs.

The expression of the Hh-binding proteins Hip and Gas1 by thymic DCs indicates that they have the ability to modulate their own Hh responses, as well as those that take place in neighboring Hh-responsive thymic cells. Hip is a membrane protein, positively regulated by Hh signaling, which competes with Ptc for binding the Hh ligands. Hip does not regulate Smo activity but exclusively sequesters the ligand, consequently attenuating the Hh signaling and forming a negative-feedback loop with Hh ligands [28, 38]. Gas1 is a glycosylphosphatidylinositol-linked membrane glycoprotein, which controls Hh ligand availability by binding to the ligand, and acts as a Hh pathway antagonist [27]. The existence of a significant proportion of thymic DCs, which express Ptc but not Smo at the plasma membrane, suggests that Ptc alone could also participate in the modulation of Hh responses, as apart from repressing Smo signaling, it can function sequestering and internalizing Hh proteins, which limits their availability and creates a barrier to their further movement [39, 40]. The possibility that this Hh internalization is linked to signal transduction has also been proposed [40].

Thymic DCs also synthesize and secrete Shh and constitute together with medullary and subcapsular epithelial cells the main source of Shh in the thymus [15]. Until now, it is unclear whether Shh establishes a functional gradient in the human thymus, as described in other tissues [1, 41]. Nevertheless, it is likely that the differential Shh production and the different modulatory Hh-binding proteins, expressed by thymic DCs and epithelial cells [15], contribute to the appearance of distinct thymic microenvironments, where various Shh concentrations can differentially affect, quantitative and qualitatively, distinct Hh-sensitive thymic cell populations.

We also demonstrate that Shh produced by thymic DCs is used autocrinally to increase their survival. Although many authors have described that different factors, including TNF-related activation-induced cytokine (TRANCE), IL-12, IL-15, GM-CSF, TLR ligands, and CD40 ligation, influence the viability of peripheral DCs [31–33, 42, 43], to our knowledge, only one report has previously investigated this issue with thymic DCs. Vasilijic et al. [44] described that the addition of GM-CSF to rat thymic DC cultures inhibited their apoptosis and in correlation, up-regulated bcl-2 expression. Our results demonstrate that Shh also promotes thymic DC survival, inducing the up-regulation of the antiapoptotic bcl-2 and bcl-X_L proteins. The survival-promoting effects of Shh have been reported in other different cell types [17, 34, 45–47], and interestingly, *bcl-2* has been described recently as a Hh target gene, whose transcription is regulated by Gli1 and mainly Gli2 [48, 49]. Although as pointed out above, the regulation of thymic DC survival has been poorly investigated, several authors, using different experimental approaches [50–52], have studied the

lifespan of DCs in the thymus gland. All of these reports agree to conclude that thymic DCs exhibit a rapid turnover of 2–3 weeks, and we here propose that during that time period, Shh could be a main factor involved in promoting thymic DC survival in an autocrine manner.

Thymic DCs play an important role presenting self-antigens and inducing apoptotic death of potentially autoreactive developing T cells [21, 22]. This process requires DC–thymocyte contacts, clearly mediated by CD40–CD40L interactions [53, 54], which induce the survival and activation of DCs [55–57]. An important finding of this work is that an autocrine Shh signaling is required for the CD40-induced survival and activation of thymic DCs, as shown by the fact that the Hh signaling inhibitor cyclopamine abrogates the increase in thymic DC viability and the up-regulation of HLA-DR, CD80, CD86, and CD83 cell markers induced by CD40 ligation. Also in support, the allostimulatory capacity of thymic DCs is notably impaired after blocking Hh signaling with cyclopamine. In contrast, Rowbotham et al. [58] have reported that the intrathymic negative selection of a transgenic TCR was increased in fetal and neonatal Shh^{-/-} mice. The apparent discrepancy between these results could reflect a differential involvement of Shh signaling in the first processes of deletion of autoreactive thymocytes occurring in the perinatal period, and those taking place in the steady-state adult thymus. Alternatively, species-specific differences in Shh requirement during intrathymic-negative selection could also explain the different results.

The survival of activated thymic DCs and therefore, their functionality must be finely controlled. As described with peripheral DCs, their limited lifespan would be controlled through the maintenance, activation, or silencing of several survival signals [32, 59–61]. Our results also show that activated thymic DCs exhibit a decreased autocrine Shh production as well as a reduced expression of Hh receptors. This down-regulation of Hh signaling would drive to a decrease in thymic DC longevity and would constitute an important mechanism for controlling the turnover and functionality of thymic DCs.

In the future, it would be interesting to examine whether the Hh signaling pathway also regulates the lifespan of peripheral DCs and therefore, whether Hh proteins could be used to control the efficacy of DCs used as vaccines.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants BFU2006-00651/BMC and BFU2004-03132 from the Ministerio de Educación y Ciencia, RD06/0010/0003 from the Instituto de Salud Carlos III, and GR85/06-910552 from the Universidad Complutense y Comunidad Autónoma de Madrid. We thank Curis for providing human Shh protein, Dr. W. Gaffield for the gift of cyclopamine, and Dr. F. Villagrà and the Pediatric Cardiosurgery Units from Hospital La Zarzuela and Hospital Madrid-Montepíncipe for the thymus samples.

REFERENCES

- Ingham, P. W., McMahon, A. P. (2001) Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev.* **15**, 3059–3087.
- McMahon, A. P., Ingham, P. W., Tabin, C. J. (2003) Developmental roles and clinical significance of Hedgehog signaling. *Curr. Top. Dev. Biol.* **53**, 1–114.
- Mullor, J. L., Sanchez, P., Altaba, A. R. (2002) Pathways and consequences: Hedgehog signaling in human disease. *Trends Cell Biol.* **12**, 562–569.
- Nieuwenhuis, E., Hui, C. C. (2005) Hedgehog signaling and congenital malformations. *Clin. Genet.* **67**, 193–208.
- Evangelista, M., Tian, H., de Sauvage, F. J. (2006) The Hedgehog signaling pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.* **12**, 5924–5928.
- Dellovade, T., Romer, J. T., Curran, T., Rubin, L. L. (2006) The Hedgehog pathway and neurological disorders. *Annu. Rev. Neurosci.* **29**, 539–563.
- Hooper, J. E., Scott, M. P. (2005) Communicating with Hedgehogs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 306–317.
- Huangfu, D., Anderson, K. V. (2006) Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from *Drosophila* to vertebrates. *Development* **133**, 3–14.
- Jia, J., Jiang, J. (2006) Decoding the Hedgehog signal in animal development. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 1249–1265.
- Kasper, M., Regl, G., Frischauf, A. M., Aberger, F. (2006) Gli transcription factors: mediators of oncogenic Hedgehog signaling. *Eur. J. Cancer* **42**, 437–445.
- Koebnick, K., Pieler, T. (2002) Gli-type zinc finger proteins as bipotential transducers of Hedgehog signaling. *Differentiation* **70**, 69–76.
- Ruiz i Altaba, A. (1999) Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease. *Development* **126**, 3205–3216.
- Outram, S. V., Varas, A., Pepicelli, C. V., Crompton, T. (2000) Hedgehog signaling regulates differentiation from double-negative to double-positive thymocyte. *Immunity* **13**, 187–197.
- Varas, A., Hager-Theodorides, A. L., Sacedon, R., Vicente, A., Zapata, A. G., Crompton, T. (2003) The role of morphogens in T-cell development. *Trends Immunol.* **24**, 197–206.
- Sacedon, R., Varas, A., Hernandez-Lopez, C., Gutierrez-deFrias, C., Crompton, T., Zapata, A. G., Vicente, A. (2003) Expression of Hedgehog proteins in the human thymus. *J. Histochem. Cytochem.* **51**, 1557–1566.
- Shah, D. K., Hager-Theodorides, A. L., Outram, S. V., Ross, S. E., Varas, A., Crompton, T. (2004) Reduced thymocyte development in Sonic Hedgehog knockout embryos. *J. Immunol.* **172**, 2296–2306.
- Gutierrez-Frias, C., Sacedon, R., Hernandez-Lopez, C., Cejalvo, T., Crompton, T., Zapata, A. G., Varas, A., Vicente, A. (2004) Sonic Hedgehog regulates early human thymocyte differentiation by counteracting the IL-7-induced development of CD34+ precursor cells. *J. Immunol.* **173**, 5046–5053.
- Hager-Theodorides, A. L., Dessens, J. T., Outram, S. V., Crompton, T. (2005) The transcription factor Gli3 regulates differentiation of fetal CD4–CD8– double-negative thymocytes. *Blood* **106**, 1296–1304.
- El Andaloussi, A., Graves, S., Meng, F., Mandal, M., Mashayekhi, M., Aifantis, I. (2006) Hedgehog signaling controls thymocyte progenitor homeostasis and differentiation in the thymus. *Nat. Immunol.* **7**, 418–426.
- Ardavin, C. (1997) Thymic dendritic cells. *Immunol. Today* **18**, 350–361.
- Gallegos, A. M., Bevan, M. J. (2006) Central tolerance: good but imperfect. *Immunol. Rev.* **209**, 290–296.
- Wu, L., Shortman, K. (2005) Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Semin. Immunol.* **17**, 304–312.
- Varas, A., Jimenez, E., Sacedon, R., Rodriguez-Mahou, M., Maroto, E., Zapata, A. G., Vicente, A. (2000) Analysis of the human neonatal thymus: evidence for a transient thymic involution. *J. Immunol.* **164**, 6260–6267.
- Bhardwaj, G., Murdoch, B., Wu, D., Baker, D. P., Williams, K. P., Chadwick, K., Ling, L. E., Karanu, F. N., Bhatia, M. (2001) Sonic Hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat. Immunol.* **2**, 172–180.
- Pepinsky, R. B., Zeng, C., Wen, D., Rayhorn, P., Baker, D. P., Williams, K. P., Bixler, S. A., Ambrose, C. M., Garber, E. A., Miatkowski, K., Taylor, F. R., Wang, E. A., Galdes, A. (1998) Identification of a palmitic acid-modified form of human Sonic Hedgehog. *J. Biol. Chem.* **273**, 14037–14045.
- Zaphiropoulos, P. G., Uden, A. B., Rahnama, F., Hollingsworth, R. E., Toftgard, R. (1999) PTCH2, a novel human Patched gene, undergoing alternative splicing and up-regulated in basal cell carcinomas. *Cancer Res.* **59**, 787–792.
- Lee, C. S., Buttitta, L., Fan, C. M. (2001) Evidence that the WNT-inducible growth arrest-specific gene 1 encodes an antagonist of Sonic Hedgehog signaling in the somite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 11347–11352.
- Chuang, P. T., McMahon, A. P. (1999) Vertebrate Hedgehog signaling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature* **397**, 617–621.
- Motoyama, J., Takabatake, T., Takeshima, K., Hui, C. (1998) Ptch2, a second mouse Patched gene is co-expressed with Sonic Hedgehog. *Nat. Genet.* **18**, 104–106.
- Chen, J. K., Taipale, J., Young, K. E., Maiti, T., Beachy, P. A. (2002) Small molecule modulation of Smoothened activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14071–14076.
- Pirtskhalaishvili, G., Shurin, G. V., Esche, C., Cai, Q., Salup, R. R., Bykovskaia, S. N., Lotze, M. T., Shurin, M. R. (2000) Cytokine-mediated protection of human dendritic cells from prostate cancer-induced apoptosis is regulated by the Bcl-2 family of proteins. *Br. J. Cancer* **83**, 506–513.
- Hou, W. S., Van Parijs, L. (2004) A Bcl-2-dependent molecular timer regulates the lifespan and immunogenicity of dendritic cells. *Nat. Immunol.* **5**, 583–589.
- Bjorck, P., Banchereau, J., Flores-Romo, L. (1997) CD40 ligation counteracts Fas-induced apoptosis of human dendritic cells. *Int. Immunol.* **9**, 365–372.
- Lowrey, J. A., Stewart, G. A., Lindey, S., Hoyne, G. F., Dallman, M. J., Howie, S. E., Lamb, J. R. (2002) Sonic Hedgehog promotes cell cycle progression in activated peripheral CD4(+) T lymphocytes. *J. Immunol.* **169**, 1869–1875.
- Stewart, G. A., Lowrey, J. A., Wakelin, S. J., Fitch, P. M., Lindey, S., Dallman, M. J., Lamb, J. R., Howie, S. E. (2002) Sonic Hedgehog signaling modulates activation of and cytokine production by human peripheral CD4+ T cells. *J. Immunol.* **169**, 5451–5457.
- Daya-Grosjean, L., Couve-Privat, S. (2005) Sonic Hedgehog signaling in basal cell carcinomas. *Cancer Lett.* **225**, 181–192.
- Rahnama, F., Toftgard, R., Zaphiropoulos, P. G. (2004) Distinct roles of PTCH2 splice variants in Hedgehog signaling. *Biochem. J.* **378**, 325–334.
- Chuang, P. T., Kawcak, T., McMahon, A. P. (2003) Feedback control of mammalian Hedgehog signaling by the Hedgehog-binding protein, Hip1, modulates Fgf signaling during branching morphogenesis of the lung. *Genes Dev.* **17**, 342–347.
- Chen, Y., Struhl, G. (1996) Dual roles for Patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* **87**, 553–563.
- Incardona, J. P., Lee, J. H., Robertson, C. P., Enga, K., Kapur, R. P., Roelink, H. (2000) Receptor-mediated endocytosis of soluble and membrane-tethered Sonic Hedgehog by Patched-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 12044–12049.
- Gritli-Linde, A., Lewis, P., McMahon, A. P., Linde, A. (2001) The whereabouts of a morphogen: direct evidence for short- and graded long-range activity of Hedgehog signaling peptides. *Dev. Biol.* **236**, 364–386.
- Wong, B. R., Josien, R., Lee, S. Y., Sauter, B., Li, H. L., Steinman, R. M., Choi, Y. (1997) TRANCE (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J. Exp. Med.* **186**, 2075–2080.
- Rabinovich, G. A., Riera, C. M., Iribarren, P. (1999) Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor protects dendritic cells from liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate-induced apoptosis through a Bcl-2-mediated pathway. *Eur. J. Immunol.* **29**, 563–570.
- Vasilijic, S., Colic, M., Vucevic, D. (2003) Granulocyte-macrophage colony stimulating factor is an anti-apoptotic cytokine for thymic dendritic cells and a significant modulator of their accessory function. *Immunol. Lett.* **86**, 99–112.
- Charrier, J. B., Lapointe, F., Le Douarin, N. M., Teillet, M. A. (2001) Anti-apoptotic role of Sonic Hedgehog protein at the early stages of nervous system organogenesis. *Development* **128**, 4011–4020.
- Cobourne, M. T., Hardcastle, Z., Sharpe, P. T. (2001) Sonic Hedgehog regulates epithelial proliferation and cell survival in the developing tooth germ. *J. Dent. Res.* **80**, 1974–1979.
- Cann, G. M., Lee, J. W., Stockdale, F. E. (1999) Sonic Hedgehog enhances somite cell viability and formation of primary slow muscle fibers in avian segmented mesoderm. *Anat. Embryol. (Berl.)* **200**, 239–252.
- Bigelow, R. L., Chari, N. S., Uden, A. B., Spurgers, K. B., Lee, S., Roop, D. R., Toftgard, R., McDonnell, T. J. (2004) Transcriptional regulation of

- bcl-2 mediated by the Sonic Hedgehog signaling pathway through gli-1. *J. Biol. Chem.* **279**, 1197–1205.
49. Regl, G., Kasper, M., Schnidar, H., Eichberger, T., Neill, G. W., Philpott, M. P., Esterbauer, H., Hauser-Kronberger, C., Frischauf, A. M., Aberger, F. (2004) Activation of the BCL2 promoter in response to Hedgehog/GLI signal transduction is predominantly mediated by GLI2. *Cancer Res.* **64**, 7724–7731.
 50. Kampinga, J., Nieuwenhuis, P., Roser, B., Aspinall, R. (1990) Differences in turnover between thymic medullary dendritic cells and a subset of cortical macrophages. *J. Immunol.* **145**, 1659–1663.
 51. Wu, L., Vremec, D., Ardavin, C., Winkel, K., Suss, G., Georgiou, H., Maraskovsky, E., Cook, W., Shortman, K. (1995) Mouse thymus dendritic cells: kinetics of development and changes in surface markers during maturation. *Eur. J. Immunol.* **25**, 418–425.
 52. Kamath, A. T., Henri, S., Batty, F., Tough, D. F., Shortman, K. (2002) Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood* **100**, 1734–1741.
 53. Foy, T. M., Page, D. M., Waldschmidt, T. J., Schoneveld, A., Laman, J. D., Masters, S. R., Tygrett, L., Ledbetter, J. A., Aruffo, A., Claassen, E., Xu, J. C., Flavell, R. A., Oehen, S., Hedrick, S. M., Noelle, R. J. (1995) An essential role for gp39, the ligand for CD40, in thymic selection. *J. Exp. Med.* **182**, 1377–1388.
 54. Williams, J. A., Sharrow, S. O., Adams, A. J., Hodes, R. J. (2002) CD40 ligand functions non-cell autonomously to promote deletion of self-reactive thymocytes. *J. Immunol.* **168**, 2759–2765.
 55. Vandenabeele, S., Hochrein, H., Mavaddat, N., Winkel, K., Shortman, K. (2001) Human thymus contains 2 distinct dendritic cell populations. *Blood* **97**, 1733–1741.
 56. Bendriss-Vermare, N., Barthelemy, C., Durand, I., Bruand, C., Dezutter-Dambuyant, C., Moulian, N., Berrih-Aknin, S., Caux, C., Trinchieri, G., Briere, F. (2001) Human thymus contains IFN- α -producing CD11c(–), myeloid CD11c(+), and mature interdigitating dendritic cells. *J. Clin. Invest.* **107**, 835–844.
 57. Schmitt, C., Fohrer, H., Beaudet, S., Palmer, P., Alpha, M. J., Canque, B., Gluckman, J. C., Dalloul, A. H. (2000) Identification of mature and immature human thymic dendritic cells that differentially express HLA-DR and interleukin-3 receptor in vivo. *J. Leukoc. Biol.* **68**, 836–844.
 58. Rowbotham, N. J., Hager-Theodorides, A. L., Cebecauer, M., Shah, D. K., Drakopoulou, E., Dyson, J., Outram, S. V., Crompton, T. (2007) Activation of the Hedgehog signaling pathway in T-lineage cells inhibits TCR repertoire selection in the thymus and peripheral T-cell activation. *Blood* **109**, 3757–3766.
 59. Nopora, A., Brocker, T. (2002) Bcl-2 controls dendritic cell longevity in vivo. *J. Immunol.* **169**, 3006–3014.
 60. Hon, H., Rucker III, E. B., Hennighausen, L., Jacob, J. (2004) bcl-xL is critical for dendritic cell survival in vivo. *J. Immunol.* **173**, 4425–4432.
 61. Peng, S., Kim, T. W., Lee, J. H., Yang, M., He, L., Hung, C. F., Wu, T. C. (2005) Vaccination with dendritic cells transfected with BAK and BAX siRNA enhances antigen-specific immune responses by prolonging dendritic cell life. *Hum. Gene Ther.* **16**, 584–593.